



Deteção e caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais e em animais do Jardim Zoológico de Lisboa

Iara Camões de Matos Ervideira da Silva

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Doutora Margarida Barata
Doutor Ricardo Santos

Agradecimentos

Todo este percurso foi possível graças a um infindável número de pessoas, que me ajudaram e que permitiram a finalização de um marco tão importante na minha vida, sendo por isso imprescindível agradecer a todos.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador externo, Doutor Ricardo Santos, e ao meu Coorientador, Doutor Jacinto Gomes, por todo o apoio ao longo deste árduo ano de trabalho. Foi sem dúvida um ano de muita aprendizagem e que permitiu que eu crescesse bastante a nível profissional e pessoal. A ajuda, paciência e motivação demonstrada por ambos foi essencial para que este fosse um ano formidável.

Quero também agradecer à minha orientadora interna, Doutora Margarida Barata, pela sua disponibilidade e simpatia demonstrada sempre que foi necessário.

Deixo também um especial agradecimento à Doutora Sónia Matias, Doutora Arlete Sogorb, Doutora Teresa Lobo Fernandes, Doutor Rui Bernardino, Doutor Narciso Lapão e à administração do Jardim Zoológico de Lisboa, pela disponibilidade, amabilidade e por terem permitido que esta dissertação de Mestrado fosse possível.

Agradeço também aos restantes membros de ambas as instituições onde realizei a dissertação, Instituto Superior Técnico (IST) e Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), em especial à Silvia Monteiro, Mário Freire e João Fernandes, na primeira, e D. Maria e Lucinda, na segunda, por tudo aquilo que me ensinaram e por me terem recebido e aceite no seu meio de trabalho. Gostaria também de agradecer aos estagiários do IST, Miguel de Oliveira e Catarina Martins, por toda a ajuda e pelo companheirismo demonstrado no pouco tempo que passei com eles nesta instituição.

Por tudo o que me ensinaram e por toda ajuda prestada durante todo o Mestrado, agradeço também às Coordenadoras do Mestrado em Microbiologia Aplicada, Doutora Lélia Chambel e Doutora Ana Reis, pois sem elas nada disto seria possível.

Agradeço também aos meus pais, Carla Camões de Matos e Carlos Silva, aos meus avós maternos, Luís Camões de Matos e Maria Violante dos Santos, e paternos, Carlos Silva e Alzira Silva, por me terem ajudado em tudo o que precisei, por terem acreditado em mim e por todo o carinho que me deram, pois sem eles nada disto seria possível.

Gostaria também de agradecer ao meu namorado Pedro Rodrigues, por ter estado presente e me ter apoiado sempre, pela paciência e motivação, pois permitiu que todo este caminho fosse mais fácil de superar.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a toda a restante família e a todos os amigos e colegas da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa que conheci durante o percurso, em especial à Danielle de Sotti, que esteve sempre presente e sempre me ajudou e motivou quando foi preciso.

Obrigada a todos, foram sem dúvida essenciais!

Índice

Agradecimentos	I
Índice	II
Resumo	IV
Abstract.....	V
Lista de Tabelas.....	VI
Lista de Figuras	VII
Lista de Gráficos	VIII
Lista de Equações.....	IX
Lista de Abreviaturas.....	X
1. Introdução	1
1.1. Perspetiva Histórica.....	1
1.2. Classificação Taxonómica	2
1.3. Ciclo de Vida	3
1.4. Presença em Animais	5
1.5. Presença no Ambiente e a sua Transmissão.....	8
1.6. Métodos Analíticos para Detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp.	9
1.6.1. Água	10
1.6.2. Fezes	12
1.7. Diferenciação Genética	13
1.8. Saúde pública	14
1.9. Objetivos	15
2. Materiais e Métodos	16
2.1. Amostragem	16
2.1.1. Amostras de Água.....	16
2.1.2. Amostras de Fezes	16
2.2. Filtração e Concentração das Amostras de Água	18
2.3. Preparação das Amostras de Fezes.....	18
2.3.1. Método de Sedimentação Difásica de Ritchie Modificado.....	18
2.3.2. Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada das Amostras de Fezes.....	19
2.4. Extração e Purificação de Ácidos Nucleicos.....	19
2.4.1. Otimização do Protocolo Extração de Ácidos Nucleicos	19
2.4.2. Otimização da Purificação de Ácidos Nucleicos das Amostras de Água.....	20
2.4.3. Purificação de Ácidos Nucleicos das Amostras de Fezes.....	20
2.5. Detecção de <i>Cryptosporidium</i> por Técnicas Moleculares.....	21
2.5.1. Otimização do Protocolo de Amplificação	21
2.5.1.1. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Convencional	21
2.5.1.2. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Quantitativo em Tempo Real	22
2.5.1.3. Avaliação de Protocolos para PCR Quantitativo em Tempo Real	23

2.6. Caracterização Genética de <i>Cryptosporidium</i>	23
2.6.1. Detecção e Diferenciação de <i>Cryptosporidium</i> através do Gene 18S rRNA.....	23
2.6.2. Detecção e Diferenciação de <i>Cryptosporidium</i> através do Gene <i>gp60</i>	25
3. Resultados e Discussão	26
3.1. Análise Microscópica por Coloração Ziehl-Neelsen Modificada.....	26
3.2. Otimização da Extração e Purificação de ácidos nucleicos.....	28
3.3. Detecção de <i>Cryptosporidium</i> por Técnicas Moleculares.....	29
3.3.1. Otimização do Protocolo de Amplificação	29
3.3.1.1. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Convencional	29
3.3.1.2. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Quantitativo em Tempo Real	30
3.3.1.3. Avaliação de Protocolos para PCR Quantitativo em Tempo Real	30
3.4. Análise das Amostras de Fezes por PCR Quantitativo em Tempo Real.....	31
3.5. Comparação dos Resultados obtidos na Análise por Microscopia e por PCR Quantitativo em Tempo Real das Amostras de Fezes.....	33
3.6. Análise das Amostras de Água por PCR Quantitativo em Tempo Real.....	40
3.7. Caracterização Genética de <i>Cryptosporidium</i>	40
3.7.1. Detecção e Diferenciação de <i>Cryptosporidium</i> através do Gene 18S rRNA.....	40
3.7.2. Detecção e Diferenciação de <i>Cryptosporidium</i> através do Gene <i>gp60</i>	42
4. Conclusão	43
5. Bibliografia.....	44
6. Anexos	60
Anexo I – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de <i>Cryptosporidium</i> nos mesmos, incluindo a espécie....	60

Resumo

Cryptosporidium é o protozoário responsável pela criptosporidiose, uma doença gastrointestinal. Este organismo pode ser encontrado em humanos e em várias espécies de animais, e pode ser transmitido através de várias fontes de contaminação, tanto de forma direta como indireta. De momento existem 31 espécies descritas, umas mais importantes que outras para a saúde pública devido a serem zoonóticas, tais como *C. parvum* e *C. hominis*. Devido a este parasita ser bastante resistente aos vários desinfetantes utilizados no tratamento de água, como o cloro, é importante a vigilância de possíveis fontes de contaminação e estar atento a possíveis sintomas que possam surgir em pessoas ou animais provenientes de sistemas de água não tratados e consequentemente com maior risco de contaminação, de maneira a não haver o aparecimento de surtos, que poderão ter consequências nefastas.

Este estudo teve como principal objectivo a deteção deste parasita e realizar a sua caracterização genética em fezes dos animais e na água do Jardim Zoológico de Lisboa. No decorrer do estudo foi possível a observação de várias espécies de animais infetados pelo mesmo, existindo um total de 40 positivos em 137 animais analisados através de microscopia por Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada e PCR Quantitativo em Tempo Real, sendo que também se verificou a existência de *Cryptosporidium* em uma das amostras de água analisadas por PCR Quantitativo em Tempo Real.

Das amostras positivas foi possível realizar a caracterização genética através da amplificação do gene 18S rRNA por PCR-RFLP de 4 amostras, obtendo-se positividade para a espécie *C. muris* em Pitão de Cheney (*Morelia spilota cheynei*) e Cobra do Milho (*Pantherophis guttatus*) e *Cryptosporidium* sp. em Pitão Real (*Python regius*) e Cobra Falsa Coral (*Lampropeltis triangulum*). Devido a não se ter conseguido obter uma caracterização genética da amostra de água, que obteve positividade para a presença do parasita, e de existir uma grande dispersão dos animais infetados no Jardim Zoológico não foi possível descobrir uma possível fonte de contaminação presente no mesmo, não permitindo assim criar medidas preventivas.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*; Animais Zoológico; Coloração Ziehl-Neelsen Modificada; PCR-RFLP; PCR Quantitativo em Tempo Real

Abstract

Cryptosporidium is the agent of cryptosporidiosis, a gastrointestinal disease, which can be found in humans and in a large number of animal species, and that can be transmitted by many contamination sources (via direct or indirect transmission). At this moment there are 31 species described, which some can be more important to public health because of their zoonotic potential, which is the case of *C. parvum* and *C. hominis*. Because of its higher resistance to disinfection products and because its maintenance in contaminated water bodies, it is important to monitor possible sources of infection and stay vigilante to possible symptoms showed by people or animals from non-treated water systems in order to prevent outbreaks that can lead to fatal consequences.

This study aimed to detect and do the genetic characterization of the parasite in animal feces and water from the Lisbon Zoo. It was observed the infection of a various number of different species of animals being infected by this parasite, existing a total of 40 positive animals for the presence of *Cryptosporidium* at 137 analyzed by microscopy Modified Ziehl-Neelsen staining and quantitative Real-Time PCR, and 1 positive for its presence in a water sample analyzed by quantitative Real-Time PCR.

There was possible to do the genetic characterization of 4 samples using PCR-RFLP to amplify the 18S rRNA gene, which identified *C. muris* in Carpet Python (*Morelia spilota cheynei*) and in a Corn Snake (*Pantherophis guttatus*) and *Cryptosporidium* sp. in a Ball Python (*Python regius*) and in a Milk Snake (*Lampropeltis triangulum*). Due to the lack of genetic characterization in the water sample, that was positive to the presence of the parasite, and the geographic dispersion of the infected animals in the Lisbon Zoo, was not possible to define a possible contamination source in the establishment, and so was not possible to create preventive measures.

Keywords: *Cryptosporidium*; Zoo Animals; Modified Ziehl-Neelsen Staining; PCR-RFLP; Quantitative Real-Time PCR

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Número de amostras recolhidas por família de animais	17
Tabela 2.2 - Conjunto de <i>primers</i> utilizados na Amplificação dos genes 18S rRNA e COWP por PCR Convencional.	21
Tabela 2.3 - Conjunto de sondas utilizadas na Amplificação dos genes 18S rRNA e COWP por PCR Quantitativo em Tempo Real.	22
Tabela 2.4 - Conjunto de <i>primers</i> utilizados na detecção e diferenciação de <i>Cryptosporidium</i> através do gene 18S rRNA.	24
Tabela 2.5 - Conjunto de <i>primers</i> utilizados na detecção e diferenciação de <i>Cryptosporidium</i> através do gene <i>gp60</i>	25
Tabela 3.1 - Número de Espécies/Subespécies de animais com amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp. por Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada, comparando com o número de amostras totais observadas.....	26
Tabela 3.2 - Resultados obtidos por PCR Quantitativo em Tempo Real da otimização do método de extração e purificação de <i>Cryptosporidium</i> , utilizando como inóculo inicial uma concentração de 10^5 oocistos/ mL.....	28
Tabela 3.3 - Resultados obtidos por PCR Convencional para os conjuntos de <i>primers</i> JVA, CRU18S e COWP nas diferenças temperaturas e concentrações de diluições seriadas de 1:10, com concentrações variando entre 10^3 a 10^{-1} cg/ mL, de DNA de <i>Cryptosporidium parvum</i>	30
Tabela 3.4 - Resultados de <i>Cycle Threshold</i> obtidos por PCR Quantitativo em Tempo Real para os conjuntos de <i>primers</i> JVA, CRU18S e COWP, utilizando a concentração 10^5 cg/ mL de DNA de <i>Cryptosporidium parvum</i>	30
Tabela 3.5 - Resultados de <i>Cycle Threshold</i> obtidos por PCR Quantitativo em Tempo Real nos dois protocolos analisados, utilizando diluições seriadas de 1:10 de DNA de <i>Cryptosporidium parvum</i> , com concentrações variando entre 10^5 a 10^{-1} cg/ mL, utilizando o conjunto de <i>primers</i> JVA.....	31
Tabela 3.6 - Animais cujas amostras de fezes foram consideradas positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp. e número de cópias do genoma, determinadas por PCR Quantitativo em Tempo Real.....	33
Tabela 3.7 - Comparação das amostras de fezes positivas em ambas as metodologia utilizadas na análise de <i>Cryptosporidium</i> spp., apresentando-se a vermelho os resultados em que houve concordância em ambas as técnicas.....	34
Tabela 3.8 - Amostra de água que demonstrou ser positiva para <i>Cryptosporidium</i> spp. por PCR Quantitativo em Tempo Real, apresentando a quantificação da mesma.....	40

Lista de Figuras

<u>Figura 1.1</u> - Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> , proposto por Peta L. Clode (2015).....	4
<u>Figura 2.1</u> - Imagem com a localização dos pontos de recolha das amostras de água. A – Piscina do Delfinário, B – Piscina da Lagoa, C - Filtro de Lavagem 3 da Piscina do Delfinário, D – Filtro de Lavagem 1 da Piscina do Delfinário, E – Filtro de Lavagem da Piscina da Lagoa.....	16
<u>Figura 3.1</u> - Fotografia de duas amostras positivas para a presença de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. através de análise por Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada a 100x. A – Amostra 26 (Girafa de Angola); B – Amostra 94 (Zebra de Grevy).....	28
<u>Figura 3.2</u> - Mapa do Jardim Zoológico de Lisboa com a localização dos animais infetados, detetados por ambas as técnicas utilizadas.....	39
<u>Figura 3.3</u> - Gel de Electroforese após amplificação das amostras por <i>Nested-PCR</i> . 1 – <i>Ladder</i> 100 pb; 2 – Amostra 52; 3 – Amostra 110; 4 – Amostra 111; 5 – Amostra 118; 6 – Amostra 123; 7 – Amostra 132; 8 – Amostra 136; 9 – Amostra do Filtro de Lavagem 1 do Delfinário; 10 – Controlo positivo <i>C. parvum</i>	41
<u>Figura 3.4</u> - Gel de Electroforese após digestão das amostras com enzimas <i>SspI</i> (esquerda) e <i>VspI</i> (direita) após <i>Nested-PCR</i> . 1 – <i>Ladder</i> 100 pb; 2 – Amostra 52; 3 – Amostra 110; 4 – Amostra 111; 5 – Amostra 118; 6 – Amostra 123; 7 – Amostra 132; 8 – Amostra 136; 9 – Amostra do Filtro de Lavagem 1 do Delfinário; 10 – Controlo positivo <i>C. parvum</i>	41

Lista de Gráficos

<u>Gráfico 3.1</u> - Comparação do número de animais positivos e negativos para a presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. por Coloração Ziehl-Neelsen Modificada	27
<u>Gráfico 3.2</u> – Comparação do número de animais positivos e negativos para a presença de <i>Cryptosporidium</i> spp. por PCR Quantitativo em Tempo Real.....	32

Lista de Equações

<u>Equação 3.1.</u> – Equação referente à proporção de prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. nos animais do Jardim Zoológico de Lisboa.....	33
--	----

Lista de Abreviaturas

% - percentagem
± - mais ou menos
Cg – cópias de genoma
COWP – *Cryptosporidium Oocyst Wall Protein*
DFA – método de imunofluorescência directa
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA - ensaios imunoenzimáticos
EPA - Environmental Protection Agency
EUA – Estados Unidos da América
FE - sedimentação por formol-éter
FEA - sedimentação por formol-etil acetato
G – força gravitacional
g – gramas
hsp-70 - proteína de choque térmico
IFA – método de imunofluorescência indirecta
IFT – método de imunofluorescência
IMS - método de separação imunomagnética
L – Litros
M – mol
mL – mililitros
Na – sódio
°C – graus centígrados
pb – par de bases
PBS - tampão fosfato salino
PCR – reação de cadeia de polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
RFLP - *restriction fragment length polymorphism*
RNA – ácido ribonucleico
rpm- rotações por minuto
rRNA – ácido ribonucleico ribossomal
SSU – pequena subunidade ribossomal
Tris – trisaminometano
UV – ultravioleta
V – volts
µg – microgramas
µL – microlitros
µM – micromolar

1. Introdução

Cryptosporidium é um protozoário do filo Apicomplexa, epitelial facultativo e o qual pode ser encontrado no ambiente. Este protozoário é o agente da criptosporidiose, uma doença gastrointestinal (Thompson *et al.*, 2016).

A criptosporidiose é uma infecção oportunista, a qual infecta primariamente o intestino delgado, podendo também ocorrer criptosporidiose extraintestinal em doentes imunocomprometidos, na qual poderá haver como locais de infecção o trato biliar, pâncreas ou ainda pulmões. Esta doença tal como verificado é mais severa em indivíduos imunocomprometidos, tais como doentes com SIDA, para os quais a infeção deste parasita pode ser fatal, visto o mesmo ser persistente e debilitante para indivíduos com esta condição. Os sintomas são similares quer em adultos quer em crianças, e envolvem diarreia aquosa, dores abdominais e por vezes pode originar vômitos. Quando adquirido na infância, o desenvolvimento e o crescimento da criança podem ser comprometidos com efeitos secundários permanentes (Hunter *et al.*, 2007; Mølbak *et al.*, 1997; Shrivastava *et al.*, 2017).

Os humanos não são os únicos animais que podem ser infetados por este parasita, muitos outros animais também o poderão ser, os quais poderão pertencer a famílias tais como Bovidae, Cervidae ou Boidae. Muitos desses animais poderão ter contacto entre si ou mesmo com o ser humano, como acontece com animais domésticos ou em locais confinados como Jardins Zoológicos. Se as espécies de *Cryptosporidium* presentes conseguirem infetar hospedeiros diferentes poderá existir uma contaminação inter-espécies ou zoonótica (Díaz *et al.*, 2013; Gracenea *et al.*, 2002).

1.1. Perspetiva Histórica

O organismo *Cryptosporidium* foi provavelmente descrito pela primeira vez por Clarke, em 1895, que poderá ter identificado mal os merozoítos deste parasita, dizendo que os mesmos eram um estágio de *Coccidium falsiforme* (*Eimeria falsiforme*), no qual havia uma grande quantidade de esporos. A identificação definitiva foi realizada em 1907 por Ernest E. Tyzzer, o qual fez o primeiro relatório preliminar sobre *Cryptosporidium muris*, isolado anteriormente de ratos (Tyzzer, 1907).

A primeira vez que se descobriu que este parasita era patogénico, foi em 1955 quando *Cryptosporidium meleagridis* foi encontrado em perus (Slavin, 1955).

Só em 1971, o setor veterinário começou a interessar-se por este, quando *C. parvum* foi associado a diarreias em bezerros. Após este interesse, várias investigações começaram a ser feitas e várias espécies foram descobertas, tais como *C. wairi* em porcos da Índia e *C. baileyi* em galinhas (Current *et al.*, 1986; Panciera *et al.*, 1971; Vetterling *et al.*, 1971).

A primeira vez que este protozoário foi reconhecido como agente causador de doenças em humanos foi em 1976, apesar de que só em 1982/83 a criptosporidiose começou a ser um problema significativo para a saúde pública, quando foi descoberto que causava a morte de doentes com SIDA e

que também era comum em indivíduos imunocomprometidos, sendo este a causa de diarreias agudas (Anon, 1982; Current, 1983; Forgacs *et al.*, 1983; Jokipii *et al.*, 1983; Ma & Soave, 1983; Meisel *et al.*, 1976; Nime *et al.*, 1976; Tzipori *et al.*, 1983).

A necessidade de prevenir a morte desses doentes, trouxe a urgência de criar substâncias químicas que conseguissem eliminar esse parasita mas, rapidamente, se demonstrou que este era completamente insensível a medicamentos anticoccídeos. Este protozoário, desde que foi descoberto, demonstrou características atípicas nas coccídias e similaridades com as gregarinas, por conseguinte, a sua insensibilidade aos medicamentos aumentou a crença de que provavelmente a sua classificação taxonômica estava errada, e que seria necessário a sua revisão (Appelbee *et al.*, 2005; Tenter *et al.*, 2002; Tyzzer, 1907; Thompson *et al.*, 2005).

Posteriormente à descoberta de que *Cryptosporidium* era a causa de morte de muitos doentes com SIDA, e de que tinha insensibilidade aos medicamentos, a investigação sobre o mesmo aumentou exponencialmente.

Em 1984, depois da ocorrência do primeiro surto documentado no Texas, EUA, este parasita foi reconhecido como sendo um agente patogénico de transmissão pela água. No entanto, só em 1993, após um enorme surto em Milwaukee, EUA, a importância da transmissão pela água foi reforçada (D'Antonio *et al.*, 1985; Mackenzie, 1994).

Desde este surto que muitos estudos epidemiológicos têm vindo a ser feitos, de maneira a perceber as vias de transmissão deste organismo bem como as espécies mais prevalentes e que causam mais problemas em termos de saúde pública.

1.2. Classificação Taxonómica

A Taxonomia é a ciência que identifica, descreve e classifica organismos, tais como, animais, plantas e microrganismos, baseado em observações bioquímicas, genéticas, morfológicas e comportamentais. (Convention on Biological Diversity, Março de 2017).

Quando Tyzzer (1910) propôs oficialmente *C. muris*, este parasita foi posicionado na classe Sporozoa, Subclasse Telosporidia, Ordem Coccidiomorpha, Subordem Coccidia e na Família Eimeridae. O único requisito que *Cryptosporidium* não tinha para pertencer à família Eimeridae era não ter sido demonstrado a presença de um flagelo nos microgâmetas. Dado que todos os outros requisitos estavam correctos, foi incluído nesta família em vez de nas outras duas famílias que pertencem à Subordem Coccidia.

A classificação taxonómica de *Cryptosporidium* mudou desde a sua primeira descrição, e a última alteração, que foi publicada pelo *European Journal of Protistology*, modificou essa classificação de coccidia para gregarina. Esta nova classificação é devido a recentes evidências morfológicas e genéticas, que permitiram descobrir semelhanças entre *Cryptosporidium* e as gregarinas. Essas semelhanças incluem a capacidade de completar o ciclo de vida sem que existam células de um hospedeiro, a capacidade de adaptação às condições ambientais que o rodeiam através de mudanças estruturais a nível celular, processo de *syzygy*, no qual 2 trofozoítos maduros emparelham antes da

formação de um gametócito, e também a presença de um grande gamonte extracelular (Ryan *et al.*, 2016; Valigurová *et al.*, 2007).

Esta nova classificação taxonómica, em que *Cryptosporidium* é o único microrganismo a pertencer à subclasse *Cryptogregarina*, é (Cavalier-Smith, 2014):

Filo **Apicomplexa** Levine, 1970

Classe **Gregarinomorphea** Grassé, 1953

Subclasse **Cryptogregarina** Cavalier-Smith, 2014

Ordem **Cryptogregarida** Cavalier-Smith, 2014

Família **Cryptosporididae** Leger, 1911

Género ***Cryptosporidium*** Tyzzer, 1907

Esta nova subclasse descreve os seus membros como sendo parasitas epicelulares de vertebrados, os quais possuem um organelo de alimentação semelhante ao das gregarinas mas não possuem um apicoplasto (Cavalier-Smith, 2014).

A diferenciação entre espécies de *Cryptosporidium*, não pode ser somente feita com recurso a critérios biológicos, visto que a morfologia entre espécies é bastante similar e na maior parte das vezes a mesma espécie é capaz de infetar diferentes hospedeiros. Para além disso também não se pode utilizar unicamente dados moleculares devido a ainda existir dificuldades em distinguir diferenças inter-espécies (Xiao *et al.*, 2004a).

Algumas mudanças a nível das espécies deste parasita foram feitas ao longo dos tempos, tais como a invalidação de espécies que foram criadas quando se pensava que diferentes hospedeiros eram infetados por diferentes espécies de *Cryptosporidium*, ou também devido a genótipos de espécies serem elevados para novas espécies, tal como ocorreu com o genótipo canino *C. parvum* que foi modificado para *C. canis* (Fayer *et al.*, 2001).

Atualmente existem 31 espécies *Cryptosporidium* descritas. As espécies com maior importância para a saúde pública são *C. parvum*, a qual é uma espécie zoonótica, e *C. hominis*, que tem como principal hospedeiro o Homem. Estas duas espécies são as mais importantes pois causam o maior número de infeções de *Cryptosporidium* nos humanos. Outras espécies zoonóticas, tais como, *C. canis* e *C. muris* também infectam o Homem mas, a sua presença é menos frequente (Katsumata *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2016b; Xiao *et al.*, 2007).

1.3. Ciclo de Vida

Cryptosporidium é monoxeno, ou seja, só necessita de um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida, e tem capacidade de se multiplicar através da encapsulação das células de um hospedeiro (epicelular) ou mesmo através da sua multiplicação fora das células (extracelular), como ocorre, por exemplo, no lúmen, em que a encapsulação das células não ocorre, ou em ambientes, como os

biofilmes, em que não existem células dos hospedeiros presentes. Os oocistos deste parasita são estruturas pequenas e arredondadas, com tamanhos diferentes entre espécies, mas que em média está compreendido entre 4 e 6 μm . Alguns autores, referem que este tamanho pode ser diferente consoante a técnica de análise utilizada (Centers for Disease Control and Prevention (b), Julho de 2017; Clode *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2008).

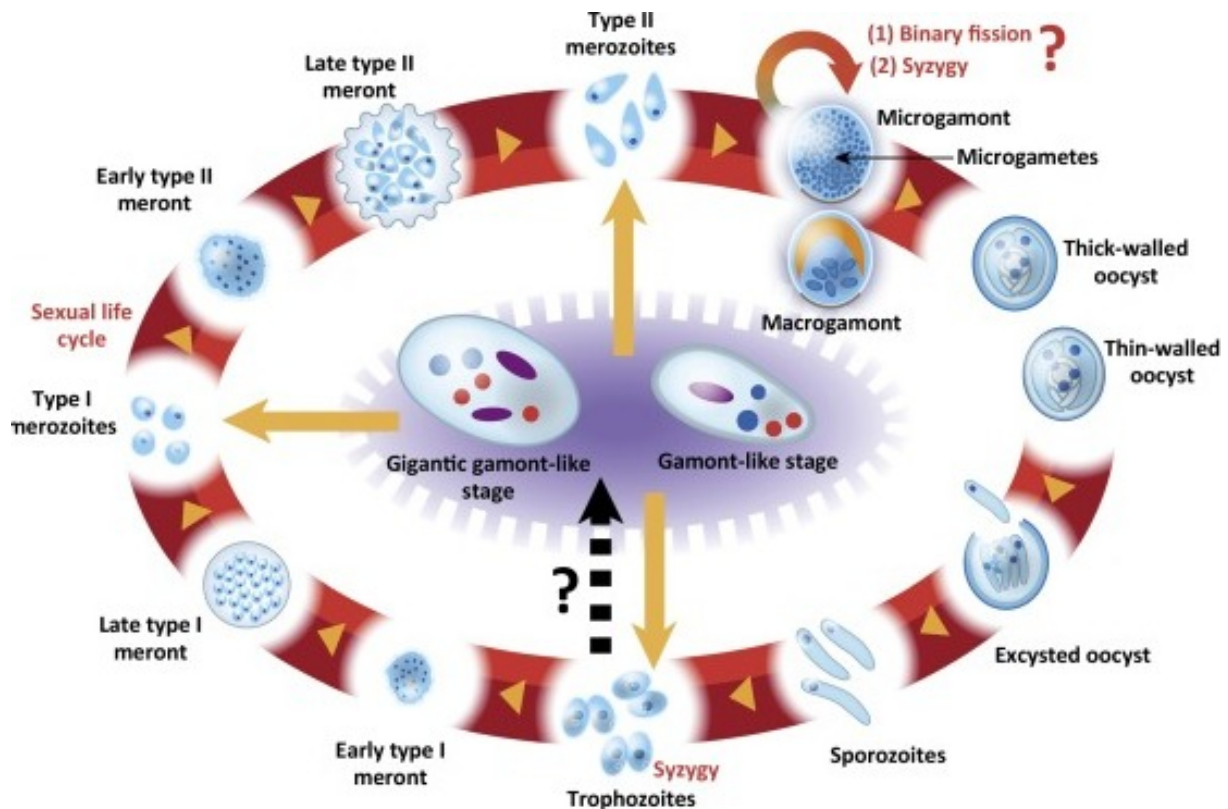


Figura 1.1 - Ciclo de vida de *Cryptosporidium*, proposto por Peta L. Clode (2015)

Este parasita possui um ciclo de vida cíclico, no qual existem duas fases de vida, a assexuada, que se inicia quando existe a indução da excitação dos oocistos, através de sinais ambientais e/ou de enzimas proteolíticas derivadas do parasita, tais como serina ou cisteína endopeptidases, que permite que os esporozoítos dentro dos mesmos sejam libertados, e a fase sexuada que se inicia com a formação dos merontes tipo II (Figura 1.1) (Bouzig *et al.*, 2013; Clode *et al.*, 2015; O'Hara & Chen, 2011).

Existem dois tipos de oocistos, os de paredes espessas, que são os oocistos que geralmente são excretados pelas fezes devido a serem bastante resistentes aos ácidos, e os de paredes finas que normalmente são os causadores das reinfecções, pois permanecem dentro do organismo do hospedeiro (Current & Reese, 1986).

Tal como referido anteriormente, a fase sexuada inicia-se com a libertação dos esporozoítos, estes vão desenvolver-se em trofozoítos, os quais poderão realizar o processo de *syzygy* ou continuar como células únicas. Os trofozoítos de seguida vão sofrer um processo de merogonia, formando assim os merontes tipo I, que possuem entre 6 a 8 merozoítos tipo I no seu interior. Quando os merozoítos são libertados vão formar-se os merontes tipo II (Clode *et al.*, 2015).

Os merontes tipo II, tal como ocorre no tipo I, possuem merozoítos no seu interior, sendo este do tipo II. Os merozoítos tipo II irão mais tarde transformar-se em macrogamontes e microgamontes, gâmeta feminino e masculino respectivamente. Os microgamontes tornam-se células multinucleadas, sendo que, cada núcleo irá ser incorporado num microgâmeta, enquanto que os macrogamontes permanecem uninucleares. Nesta fase o potencial reprodutivo de *Cryptosporidium* pode ser aumentado através de fissão binária ou de um processo de *syzygy* realizado pelos microgamontes (Aldeyarbi & Karanis, 2015; Bouzid *et al.*, 2013; Carneiro, 2012; Clode *et al.*, 2015; Koh *et al.*, 2014; Rosales *et al.*, 2005).

Para que ocorra a formação de oocistos um microgamonte irá libertar microgâmetas que irão fertilizar um macrogamonte, apesar disso, este processo ainda não foi confirmado quando se trata de um ciclo de vida em que não haja células de um hospedeiro e, sendo assim, futuras investigações terão que ser realizadas (Bouzid *et al.*, 2013; Clode *et al.*, 2015).

Para além do supra referido, existem mais dois estágios extracelulares, *gamont-like* e *gigantic gamont-like*, que podem ter origem nos esporozoítos que falharam na penetração nas células do hospedeiro e que fez com que existisse um desenvolvimento extracelular de estágios de trofozoítos móveis, ou poderão desenvolver-se de estágios de trofozoítos, tendo como principal objectivo maximizar o potencial reprodutivo sem que seja necessário reprodução sexual, de maneira a gerar mais trofozoítos e merozoítos para a produção de novos oocistos em ambientes aquáticos ou em ambientes que não haja células de hospedeiro (Clode *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2016a).

Os dois tipos de processos de multiplicação e desenvolvimento de *Cryptosporidium*, epicelular e extracelular, podem ocorrer em simultâneo no hospedeiro, de maneira a aumentar o número de oocistos (Clode *et al.*, 2015).

1.4. Presença em Animais

Desde a sua primeira identificação por Tyzzer, *Cryptosporidium* já foi descrito em diferentes animais, tais como animais domésticos, gado e animais selvagens e em cativeiro. Os animais mais suscetíveis são os mais novos, sendo os adultos normalmente assintomáticos ou imunes (Ramirez *et al.*, 2004).

Os mamíferos são os animais em que mais infecções por *Cryptosporidium* foram reportadas, apesar disso, outros animais, tais como, répteis ou aves também poderão ser infetados (Ramirez *et al.*, 2004).

Vacas, ovelhas e cabras, são considerados importantes reservatórios de *C. parvum*, sendo que foi demonstrado que o contacto com estes animais é fator de risco para a criptosporidiose nos humanos

nos EUA, Reino Unido, Irlanda e Austrália, devido a haver um grande contacto entre estes animais e o Homem (Goh *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2004).

Para além de *Cryptosporidium parvum*, estudos a nível global sugerem que o gado bovino poderá ainda ser infectado por outras três espécies principais: *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* (Xiao, 2010).

Estudos realizados a bovinos em países industrializados, como EUA, Alemanha, Espanha, Canadá, ou ainda Portugal, demonstraram a predominância de *C. parvum*, mais propriamente o subtipo IIa em bezerros, enquanto os animais mais velhos apresentavam uma maior predominância de *C. andersoni* e que poderá dever-se a práticas agrícolas intensivas que poderá facilitar a sua transmissão persistente. No caso de países em vias de desenvolvimento a espécie dominante é *C. bovis* também em bezerros (Amer *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014; Santín, 2013; Xiao, 2010).

Em fezes de ovelhas já foram encontradas pelo menos oito espécies de *Cryptosporidium*: *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. scrofarum*, *C. parvum*, *C. xiaoi*, e *C. ubiquitum*, sendo as últimas três as mais prevalentes. No caso das cabras, poucos estudos epidemiológicos foram realizados, apesar disso as espécies *C. parvum*, *C. xiaoi* e *C. ubiquitum* também já foram identificadas nestes animais (Ryan *et al.*, 2014).

As principais espécies identificadas em porcos a nível global são *C. suis* e *C. scrofarum*, apesar disso outras espécies como *C. muris*, *C. parvum* e *C. tyzzeri*, também já foram reportadas. Tal como referenciado no gado bovino, também existe uma distribuição de *C. suis* e *C. scrofarum* consoante a idade dos animais, sendo que *C. suis* é mais comumente encontradas em leitões e *C. scrofarum* em porcos mais velhos (Němejc *et al.*, 2013; Yui *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013).

Os animais domésticos, cães e gatos, também poderão também ser infectados por este parasita, sendo que nos estudos realizados demonstram que a maior parte das infeções são por *C. canis* e *C. felis* respectivamente. Ocasionalmente também foram reportados a presença de *C. muris* e *C. parvum* nas fezes destes animais (Lucio-Forster *et al.*, 2010).

Cryptosporidium cuniculus foi identificado em coelhos na República Checa, sendo no entanto capaz de infectar também outros animais e humanos (Ryan *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2010).

Veados selvagens também apresentam infeções por parte deste parasita, tendo sido identificadas espécies como *C. ubiquitum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. parvum* e ainda um genótipo semelhante ao *C. hominis*. Também em cervídeos em cativeiro existe informação de infeção por *C. parvum* e *C. ubiquitum* (Amer *et al.*, 2009; Cinque *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2011; García-Presedo *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2011; Nolan *et al.*, 2013).

Animais similares podem ser infetados por parasitas geneticamente similares, que é o que ocorre nas raposas, as quais também são infetadas por *C. canis*, tal como ocorre nos cães, mas por uma variante da mesma, designada por *C. canis* subtipo de raposa, para além de que também poderão apresentar a presença de um outro genótipo similar ao *C. macropodum* (Ng *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2002).

Outro exemplo de mamíferos que poderão ser infetados são os marsupiais, os quais já foram reportados como podendo ser infetados por *C. fayeri* e *C. macropodum*, posteriormente designados por genótipo de marsupial I e II, respetivamente (Power, 2010; Power & Ryan, 2008; Ryan *et al.*, 2008; Ryan & Power, 2012).

Existe também a presença de *Cryptosporidium* em mamíferos aquáticos, como focas e golfinhos, sendo que nos primeiros já foram identificadas espécies como *C. muris*, genótipo de foca 1 a 4 e ainda um genótipo similar ao das doninhas, e nos segundos foi identificado a presença de *C. parvum* (Bass *et al.*, 2012; Reboredo-Fernández *et al.*, 2014; Rengifo-Herrera *et al.*, 2011; Rengifo-Herrera *et al.*, 2013; Santin *et al.*, 2005).

No caso das aves existem três grandes espécies de *Cryptosporidium* associadas a estes animais, sendo as mesmas, *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*. *C. meleagridis* é uma espécie que possui um enorme espectro de hospedeiros, sendo a mesma a terceira maior espécie a nível de prevalência nos humanos. A enorme capacidade desta espécie infectar humanos e mamíferos está associada à sua relação filogenética com *C. hominis* e *C. parvum*, o que poderá sugerir que os mamíferos foram os hospedeiros originais tendo mais tarde havido uma adaptação às aves (Elwin *et al.*, 2012; Leoni *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2014; Xiao, 2010).

Outras espécies já foram também identificadas num pequeno número de aves, tais como, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. serpentis*, *C. muris*, *C. andersoni* e ainda o genótipo I do rato-almiscarado, sendo que algumas poderão dever-se à ingestão accidental de oocistos destes organismos (Ryan, 2010).

Em répteis *C. serpentis*, *C. varanii* e *C. ducismarci* são as espécies mais identificadas nestes animais, mas existem alguns genótipos que já foram identificados nos mesmos, sendo estes, genótipo I de tartaruga e genótipo I e II de cobra (Ježková *et al.*, 2016; Traversa, 2010).

Pouco se sabe quanto à infeção por parte de *Cryptosporidium* nos anfíbios, sendo no momento *C. fragile*, a única espécie reportada (Jirku *et al.*, 2008; Ryan, 2010).

Já foi descrito a presença de *Cryptosporidium* tanto em peixes de água doce como de salgada, sendo que a única espécie específica reconhecida de momento é *C. molnari*. Outra possível espécie, *C. scophthalmi*, foi descrita em 2004 depois de ter sido encontrada num rodvalho mas, ainda é considerada um *nomen nudum* até que dados genéticos sejam fornecidos. Um total de 13 espécies/genótipos adicionais já foram identificados em peixes através da utilização de técnicas moleculares, genótipo de animais provenientes de piscinas 1 a 8, genótipo III de rato, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. xiaoi* e *C. scrofarum*. A prevalência tanto de *C. parvum* como de *C. hominis* em peixes é bastante baixa (< 1 %), e devido a isso estes não são considerados um importante reservatório para as infeções zoonóticas em humanos (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Alvarez-Pellitero & Stijà-Bobadilla, 2002; Koinari *et al.*, 2013).

Em humanos este protozoário geralmente causa diarreia aquosa e dores abdominais podendo também provocar vômitos, anorexia e febre. Os sintomas associados à criptosporidiose duram aproximadamente sete dias e geralmente possuem uma autolimitação, durando a doença à volta de duas semanas neste tipo de indivíduos, podendo haver ainda a existência de sintomas esporádicos até um mês, ou ainda tornar-se uma doença crónica em pacientes imunocomprometidos (Mayoclinic, Julho de 2017; Palmer & Biffin, 1990).

Aves e mamíferos vão demonstrar sintomas semelhantes aos supra mencionados, tais como, diarreia aquosa amarelada, que poderá levar à desidratação, febre, inapetência e também perda de peso. Em cobras e lagartos os sintomas são diferentes, incluindo perda de apetite, regurgitação pós-prandial, perda de peso progressiva, letargia e ainda inchaço corporal, sendo esta doença persistente podendo durar de meses a dois anos. Para além disso, os répteis adultos são mais comumente infectados por este parasita do que os mais novos (O'Donoghue, 1995).

Existem várias espécies de *Cryptosporidium* que são zoonóticas, as quais incluem *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* e *Cryptosporidium* genótipo equino. Das espécies referidas anteriormente, *C. hominis* e *C. parvum* são as que mais frequentemente infetam os humanos (Ryan *et al.*, 2016b).

Apesar de os humanos serem o maior hospedeiro de *C. hominis*, este já foi isolado de animais selvagens e gado, tais como, ovelhas, cabras, dugongo, primatas não-humanos, cangurus e peixes (Abeywardena *et al.*, 2012; Connelly *et al.*, 2013; Giles *et al.*, 2009; Karim *et al.*, 2014; Koinari *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Parsons *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2012).

C. parvum é o principalmente um parasita de humanos e artiodátilos mas, também pode ser encontrado em outros animais na natureza, incluindo equinos, roedores, canídeos, macacos, mamíferos marinhos e peixes (Certad *et al.*, 2015; Gibson-Kueh *et al.*, 2011; Koinari *et al.*, 2013; Reid *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2016b; Xiao, 2010; Zahedi *et al.*, 2016).

A terceira maior espécie capaz de infetar humanos, tal como referenciado anteriormente, é *C. meleagridis*, que é uma espécie que tem como principais hospedeiros as aves (Ryan *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2016b; Xiao, 2010).

No Reino Unido, em 2008, existiu um surto por *C. cuniculus* associado à água potável, em que se descobriu que os coelhos eram a fonte dessa contaminação e, para além disso, foi também identificado como sendo a espécie presente em vários casos esporádicos de criptosporidiose em humanos (Chalmers *et al.*, 2009; Chalmers *et al.*, 2011; Elwin *et al.*, 2012; Koehler *et al.*, 2014; Martínez-Ruiz *et al.*, 2015; Puleston *et al.*, 2014).

Como é possível verificar, existem várias espécies que podem gerar um potencial surto, tal como ocorreu com *C. cuniculus* em Inglaterra, sendo assim, é importante manter os animais sob vigilância e criar medidas preventivas e de controlo, não só porque podem transmitir aos humanos, mas também porque podem transmitir para outros animais (Ryan *et al.*, 2016b).

1.5. Presença no Ambiente e a sua Transmissão

A criptosporidiose é uma doença altamente prevalente em humanos e animais em todo o mundo, existindo relatos da presença desta doença em humanos em 95 países de todos os continentes (Fayer *et al.*, 1997).

A transmissão desta doença pode ser direta ou indireta. As vias de transmissão direta são as vias fecal-oral. Esta transmissão pode ocorrer de animal-homem (zoonótica), animal-animal, homem-homem (antroponótica) e homem-animal (Xiao *et al.*, 2004a).

As vias indiretas também podem ser diferenciadas em zoonóticas e antropogénicas. No caso do ciclo zoonótico a transmissão pode ocorrer através de material contaminado de indivíduos que trabalhem com animais, ou mesmo através de contaminação ambiental, que poderá ocorrer quando fezes de animais infectados contaminam o solo e cursos de água. O ciclo antropogénico é normalmente associado a indivíduos infetados que manipulam alimentos e que contaminam esses

alimentos durante a sua preparação. Outro foco de contaminação ambiental é a libertação de esgoto não tratado, por acidente ou mesmo através de transbordo ou *bypass* de estações de tratamento de água residual durante períodos de chuva intensa (Casemore, 1990; Quiroz *et al.*, 2000; Robinson, 2005).

Para que haja um controlo de microrganismos patogénicos no ambiente, muitas vezes são utilizados desinfetantes como o cloro capazes de matar ou reduzir o número destes contaminantes. No caso do *Cryptosporidium* esta eliminação não ocorre, devido a este possuir uma parede exterior que permite que tenha uma resistência parcial ao cloro. Para além do já referenciado este parasita é também capaz de ultrapassar sistemas de tratamentos físicos, aumentando assim a sua probabilidade de ser encontrado em águas para consumo (Centers for Disease Control and Prevention (c), Julho de 2017; Laboratório de análises do Instituto Superior Técnico, Julho de 2017; United States Environmental Protection Agency, 2005).

Tal como supra referido, este parasita é resistente às concentrações de cloro normalmente utilizadas para o tratamento de água, como tal foi necessário descobrir outros desinfetantes que pudessem ser utilizados nesses tratamentos e que tivessem uma melhor eficácia para a sua inativação. Em 2001, Chauret *et al.*, observou que o dióxido de cloro era mais eficaz para a desinfeção das águas, sendo que em 2014 ainda foi observado por Murphy *et al.* que a combinação de cloro livre com dióxido de cloro ainda permitia a observação de melhores resultados (Chauret *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2014).

Possíveis surtos através da transmissão de microrganismos pela água são um grande problema em todo o mundo, com grandes encargos financeiros, devido à necessidade da monitorização constante da água e também, devido às consequências provenientes de surtos que possam ocorrer. A ocorrência, de surtos de *Cryptosporidium*, tornou-se ainda mais problemática quando foi descoberto que biofilmes podem servir como reservatórios para este parasita, pois são ambientes ricos em nutrientes, sendo portanto locais no qual este parasita consegue crescer e multiplicar, devido a conseguir obter os nutrientes necessários que se encontram presos neste ambiente. Como tal, é importante manter todas as possíveis fontes de contaminação sob controlo, de maneira a prevenir a sua transmissão tanto para pessoas como para animais (Koh *et al.*, 2013; Koh *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2016).

1.6. Métodos Analíticos para Detecção de *Cryptosporidium* spp.

A análise de amostras, para verificar a presença ou ausência de *Cryptosporidium*, passa por várias fases, desde a sua recolha até à sua análise, por metodologias como PCR e/ou microscopia.

Maior parte das metodologias utilizadas vai diferir consoante a matriz a ser analisada. Para além da matriz também se tem que ter em conta que a recuperação obtida vai depender das técnicas escolhidas para cada metodologia (Robinson, 2005).

1.6.1. Água

Dado que em águas existe normalmente uma baixa concentração de *Cryptosporidium*, para realizar a análise deste tipo de amostras é necessário concentrar um grande volume. Posteriormente é necessário realizar uma concentração das amostras antes de se proceder á detecção propriamente dita. Existem diferentes metodologias para realizar a concentração das amostras, incluindo a filtração, floculação e ainda técnicas de centrifugação (Quintero-betancourt *et al.*, 2002; Zarlenga & Trout, 2004).

Os protocolos seguidos incluem filtração, seguida de eluição, concentração, e previamente aos métodos de detecção, as amostras são purificadas. A filtração das amostras terá que ser feita tendo em conta o tamanho dos poros dos filtros ou das membranas, para que o microrganismo fique retido no mesmo (Robinson, 2005).

No caso da análise das amostras para *Cryptosporidium* ser feita por microscopia, não se realiza a extração das amostras, e é normalmente seguido o método EPA 1625. Neste método, após a filtração, eluição e concentração das amostras, preconiza uma purificação das mesmas através da utilização do método separação imunomagnética (IMS), no qual se utilizam anticorpos específicos para o *Cryptosporidium*. Neste método, oocistos de *Cryptosporidium* ligam-se a esferas magnéticas cobertas com anticorpos permitindo que haja separação dos oocistos de sujidade que possa estar presente na amostra e que interfira na visualização microscópica.

Posteriormente à purificação, é realizado a análise microscópica através da coloração dos oocistos pelo método de imunofluorescência indirecta (IFA), que utiliza anticorpos que se ligam aos antígenos dos oocistos, os quais vão apresentar uma forma esférica e corados de verde fluorescente.

Na análise pelo método de PCR tem que existir *a priori* uma extração e purificação das amostras. Para a realização desta fase utilizam-se *kits* de extração e purificação devido a serem rápidos e de fácil utilização. Na escolha dos *kits* ter-se-á que ter em conta muitos factores, como qual o microrganismo que se quer extrair ou mesmo o tipo de matriz no qual ele está presente.

Para *Cryptosporidium*, tem que se realizar um passo extra de extração devido a possuírem uma parede muito resistente que faz com que a extração pelos *kits* não seja eficiente. A sua extração poderá ser através de métodos físicos (químicos ou mecânicos) ou através do encorajamento da sua excitação. Um método químico poderá ser através da digestão pela Proteinase K e no caso de métodos físicos são exemplos a realização de procedimentos como ciclos de congelamento e descongelamento ou utilização de esferas para a disrupção da parede (Robinson, 2005; Wiedenmann *et al.*, 1998).

Após a extração e purificação das amostras, as mesmas já podem ser analisadas por variados métodos de PCR existentes, tais como PCR Convencional, *Nested*-PCR ou PCR Quantitativo em Tempo Real.

O método de PCR é uma técnica de amplificação de DNA ou RNA, desenvolvida no final dos anos 80, que consiste num método que possui três ciclos de temperaturas diferentes, que permite que haja uma multiplicação exponencial da sequência alvo inicial que se pretende amplificar. O primeiro ciclo consiste na desnaturação da cadeia dupla DNA complementar, a segunda fase no emparelhamento de um conjunto de *primers* com as cadeias em locais específicos e a terceira fase é a fase de elongação na

qual os *primers* vão participar numa reação de extensão das cadeias de DNA, em que o processo é catalisado por uma DNA polimerase termoestável, sendo que estes ciclos se repetem variadas vezes (Laboratory Centre for Disease Control, 1991).

Tal como referenciado anteriormente é utilizado um conjunto de *primers* que são complementares e que hibridam com cadeias opostas, ou seja, um liga-se à cadeia 5' e outro à 3' do ácido nucleico a amplificar, em locais específicos, permitindo assim a formação de uma grande quantidade de cópias do mesmo (Laboratory Centre for Disease Control, 1991).

Todas as técnicas de PCRs funcionam com a mesma base, ou seja, amplificação de cadeias de DNA ou RNA. Existem, no entanto, diferenças em como os resultados são observados ou que tipo de informação obtida. No caso do método de PCR Convencional no produto obtido é efectuado um gel de agarose. A esse gel é depois realizado uma electroforese, que permite através da passagem de corrente eléctrica, a separação de bandas, com diferentes massas moleculares, que poderão ser visualizadas através de um transiluminador após revelação com brometo de etídeo. Este processo permite verificar se existe a presença ou ausência do microrganismo a pesquisar ou mesmo diferenciar microrganismos a partir os perfis de restrição (Busch, U. & Nitschko, H., 1999).

O método de *Nested*-PCR funciona de igual modo ao método de PCR Convencional, a única diferença é que se realiza uma segunda PCR com o produto obtido a partir do primeiro o que permite que haja um aumento a nível da sensibilidade e da especificidade do processo (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010).

O método de PCR Quantitativo em Tempo Real apresenta diferenças quanto à informação fornecida e também quanto ao processo de obtenção de resultados. Este processo baseia-se no uso de sondas fluorescentes que permitem que haja uma monitorização da amplificação do produto durante a corrida, sendo que essas sondas são específicas para a região interna que se quer amplifica (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010).

Durante o processo vai existir uma análise da emissão de luz, possibilitando assim conhecer qual a quantidade de produto formado em cada ciclo, dando não só informações sobre a presença do microrganismo como também qual a quantidade do mesmo na amostra, em comparação com uma reta padrão de quantidades conhecidas. Esta técnica permite não só a eliminação do trabalho pós-amplificação, como ocorre com a técnica de PCR Convencional e *Nested*-PCR, em que ainda se tem que realizar uma electroforese em gel de agarose para observação dos resultados, como também possui bastantes benefícios tais como maior rapidez, reprodutibilidade e quantificação da amostra (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010).

Apesar das várias vantagens do método de PCR, o qual consegue ter uma sensibilidade bastante alta, permitindo detetar um número bastante baixo de oocistos, especificidade alta ou ainda analisar várias amostras ao mesmo tempo, existem sempre algumas factores associados às amostras que podem diminuir a *performance* desta técnica, tais como a dificuldade da obtenção de material genético dos oocistos devido à sua enorme resistência ou ainda devido à presença de substâncias que poderão inibir o processo, sais biliares ou polissacáridos complexos em amostras de fezes ou em amostras ambientais ácidos húmicos, compostos fenólicos, metais pesados ou pequenos solutos, sendo assim é essencial que estes produtos antes sejam retirados das amostras através de uma boa purificação das mesmas (Robinson, 2005).

1.6.2. Fezes

Tal como ocorre com as amostras de água, as amostras de fezes passam pelos mesmos procedimentos.

Outros procedimentos que podem ser utilizados para a concentração das amostras de fezes são, por exemplo, a sedimentação por formol-éter (FE), sedimentação por formol-etil acetato (FEA), flutuação em sal saturado, flutuação em sulfato de zinco, flutuação em sacarose, flutuação em cloreto de cálcio (Casemore, 1991; Casemore *et al.*, 1985; Sheater, 1923; Ritchie, 1948; Young *et al.*, 1979).

Das técnicas referidas foi demonstrado que a FE, também conhecida como método de sedimentação difásica de Ritchie, e a FEA resultam numa perda de oocistos, devido à densidade de *Cryptosporidium* ser diferente dos cistos para os quais estas metodologias foram originalmente criadas. O método FE foi mais tarde otimizado por Casemore *et al.* de maneira a separar os oocistos das amostras para que essa perda deixasse de ocorrer, sendo assim considerado a melhor técnica de sedimentação (Arrowood, 1997; Casemore *et al.*, 1985; Robinson, 2005).

Após a concentração das amostras, caso se queira realizar uma análise microscópica utiliza-se directamente o sedimento proveniente da concentração. Para a realização da técnica PCR as amostras terão que ser extraídas e purificadas antes de existir a sua análise. Tem de se ter em conta que para esta matriz se deve utilizar uma extração e purificação específica de maneira a não permanecerem na amostra inibidores de PCR.

A análise microscópica para *Cryptosporidium* em amostras fecais, pode ser feita utilizando variadas técnicas microscópicas, desde a utilização de microscópio ótico ou microscópio de fluorescência (Centers for Disease Control and Prevention (b), Julho de 2017).

Aquando da análise por microscopia ótica, a coloração da amostra que vai permitir diferenciar o parasita do resto da amostra, como é o caso das colorações de Ziehl-Neelsen modificada ou *acid-fast* modificada, com safranina, ou a coloração com Tricromo. Das colorações descritas tanto a coloração com Safranina como a com Tricromo, são colorações que se podem utilizar para fazer despiste de *Cryptosporidium*, sendo que só com base nos resultados obtidos não se poderá dar a confirmação da sua presença, a primeira devido aos oocistos poderem não ser corretamente corados, e a segunda devido aos oocistos não serem corados (Centers for Disease Control and Prevention (b), Julho de 2017).

A coloração de Ziehl-Neelsen Modificada, vai permitir diferenciar os oocistos do resto da amostra devido à sua natureza álcool-ácido resistente, fazendo com que o parasita apresente um tom rosado ou avermelhado, em contraste com o resto da amostra que exibe uma cor azulada (Elsafi *et al.*, 2014; Tahvildar-Biderouni & Salehi, 2014).

A técnica que permite a obtenção de uma maior combinação de sensibilidade e especificidade é a utilização do método de imunofluorescência directa (DFA), o problema com este tipo de metodologias é que devido ao longo do tempo vai deixar de existir fluorescência, sendo impossível voltar a visualizar os resultados após um período de tempo, não permitindo que haja um arquivo destes resultados (Centers for Disease Control and Prevention (a), Julho de 2017; Centers for Disease Control and Prevention (b), Julho de 2017).

Existem ainda outras técnicas que podem ser utilizadas para a realização de um diagnóstico para a presença deste parasita, tais como, ensaios imunoenzimáticos (EIA) ou testes rápidos recorrendo a imunocromatografia. Os EIA são ensaios bastante específicos e sensíveis, devido a serem usados neste processo anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para o microrganismo a analisar. Estes procedimentos são portanto bastante úteis quando existe um grande número de espécimes a serem analisados, apesar disso, em comparação com a análise microscópica, são caros não sendo por isso normalmente utilizados. Quanto à imunocromatografia pode ser utilizada a partir de espécimes preservados, e é um teste rápido e de fácil realização, tendo uma sensibilidade para *Cryptosporidium* entre 68 % a 98 % e uma especificidade entre 99 % e 100 % (Centers for Disease Control and Prevention (b), Julho de 2017; Church *et al.*, 2005; El-Moamly, 2014).

1.7. Diferenciação Genética

A diferenciação molecular de um microrganismo é importante para permitir distinguir entre microrganismos pertencentes ao mesmo género ou espécie (Xiao & Ryan, 2004; Robinson, 2005).

Esta análise é realizada com base em métodos moleculares, possibilitando diferenciar as espécies, genótipos ou subtipos que possam estar presentes. A análise genética é realizada através da seleção de genes, no genoma, que possuam regiões conservadas e/ou polimórficas que possam ter locais específicos que diferenciam entre espécies/genótipos (Robinson, 2005, Royer *et al.*, 2002; Xiao & Ryan, 2004).

Atualmente muitos dos métodos moleculares utilizados para diferenciar espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, baseiam-se numa análise por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), ou seja, análise de variações genéticas que podem ser detetadas após digestão enzimática, ou ainda através da realização de sequenciação de DNA das amostras (Jiang & Xiao, 2003; National Center for Biotechnology Information, Julho de 2017).

Os métodos referenciados anteriormente foram desenvolvidos com o intuito principal de diferenciação entre *C. parvum* e *C. hominis* (> 90 %), devido a serem as espécies que mais infectam o Homem. Foi demonstrado que existem polimorfismos entre ambas e sendo assim é possível recorrer aos métodos supra referidos para as distinguir. Apesar de ter como objetivo principal a distinção das duas espécies referidas, também existem outras espécies, de grande importância para a saúde pública, tais como *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. muris*, entre outros, que se conseguem diferenciar usando estas metodologias (Jiang & Xiao, 2003).

No caso de *Cryptosporidium* existem genes como 18S rRNA, também designado por SSU rRNA, *gp60*, *COWP*, *hsp-70*, entre outros que podem ser utilizadas para a realização da análise genética, sendo que se verificou que, através da utilização de conjuntos de *primers* correctos e da realização da amplificação pelo método de *Nested-PCR*, o gene 18S rRNA possui os melhores resultados a nível de diferenciação, apresentando também um nível de deteção bastante baixo (De Lucio *et al.*, 2016; Gobet & Toze, 2001; Jiang & Xiao, 2003; Morgan *et al.*, 2000; Pedraza-díaz *et al.*, 2001; Robinson, 2005; Sturbaum *et al.*, 2003; Sulaiman *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001).

1.8. Saúde pública

Os casos de criptosporidiose podem ser divididos em casos esporádicos ou surtos, sendo que os primeiros são os que ocorrem mais frequentemente e os quais é mais difícil de perceber qual a fonte de contaminação envolvente (Djuretic *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1998; Robinson, 2005).

Vários estudos foram realizados para perceber quais as principais causas da transmissão de *Cryptosporidium* nos casos esporádicos, o que permitiu perceber que os factores de risco podem ser diminuídos aquando do uso de medidas preventivas, tais como, práticas de boa higiene, principalmente após o contacto com doentes que possuam doenças diarreicas, antes de comer ou mesmo após o contacto com animais (Goh *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2004; Khalakdina *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2002; Robinson, 2005).

Verificou-se, através de um estudo realizado na Austrália, que existe um enorme aumento do risco de contrair criptosporidiose em piscinas e também através do contacto direto com doentes com doenças diarreicas e que ao contrário do que se poderia pensar o consumo de água da torneira não foi associado como fator de risco. Por outro lado, foi realizado um estudo em Cumbria do Norte que associou o consumo de água da torneira, não fervida, como fator de risco, diminuindo esse fator através da utilização de filtração por membranas (Goh *et al.*, 2004; Goh *et al.*, 2005; Khalakdina *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2002).

Os surtos estão associados a contaminação ambiental, estando associados a consumo de água de fornecedores municipais ou privados, piscinas, outras atividades recreacionais que envolvam água, consumo de produtos alimentares contaminados, contactos com pessoa infectadas, como hospitais, ou ainda através do contacto com animais., havendo também medidas preventivas como a monitorização e tratamento das águas, educação parental de maneira a diminuir a contaminação fecal accidental das piscinas e ainda a práticas de boa higiene aquando do manuseamento de alimentos e bebidas (Casemore *et al.*, 1997; Fayer *et al.*, 2000; Robinson, 2005; Rose *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2002)

Apesar de haver a transmissão de *Cryptosporidium* por outros meios que não a água, a maioria dos estudos realizados tem como base esta via de transmissão, devido a estar associado à maioria dos surtos que foram reportados. A prevalência de incidentes globais que tenham *Cryptosporidium* como agente infeccioso causador de diarreia é de 3-5 % da população global. O maior surto ocorreu em Milwaukee, tal como referido anteriormente em que foi estimado que aproximadamente 403.000 pessoas adoeceram (Efstratiou *et al.*, 2017; Fayer, 2004; Fayer *et al.*, 2000; Mackenzie *et al.*, 1994).

A razão deste evento foi uma incorreta instalação de um dos sistemas de monitorização de água, numa das centrais de tratamento de água, a qual fornecia água potável do lago Michigan para as pessoas da cidade de Milwaukee, não permitindo assim um correto controlo da mesma (Mackenzie *et al.*, 1994).

A deteção deste parasita nas amostras ambientais permite verificar que este existe, não permitindo saber qual a fonte do mesmo, para que seja identificado é necessário realizar caracterização molecular para tentar perceber qual a fonte e como essa fonte poderá ser diminuída ou mesmo extinguida. Muitas vezes a contaminação está associada a animais selvagens, estando por vezes associados a genótipos de espécies do parasita que são específicos para certos hospedeiros, o que permite criar medidas preventivas contra esses hospedeiros (Robinson, 2005).

Entre 2011 e 2017 foram reportados 239 surtos a nível mundial de doenças diarreicas, tendo como meio de transmissão a água, em que 63 % teve *Cryptosporidium* como o agente etiológico. Alguns dos surtos reportados neste estudo eram de anos anteriores a 2011, sendo incluídos devido a só terem sido publicados após esse ano (Efstratiou *et al.*, 2017).

Os países nos quais foram reportados os surtos referenciados anteriormente foram variados, sendo os mesmos, EUA, Austrália, Reino Unido, Noruega, China, Suécia, Irlanda, Nova Zelândia, República da Coreia e Alemanha, tendo como principais espécies encontradas *C. hominis* e *C. parvum*. Durante esse período os surtos que apresentaram maior número de casos foram nos EUA e na Suécia, um na cidade de Skellefteå e outro em Östersund, 12.154, 20.000 e aproximadamente 27.000 casos respetivamente (Efstratiou *et al.*, 2017; Guzman-Herrador *et al.*, 2015; Hlavsa *et al.*, 2011; Widerström *et al.*, 2014).

Quanto aos EUA o estudo foi realizado entre 2007-2008, com um total de 60 surtos, sendo que se observou a presença de *C. hominis* em 14 dos surtos, *C. parvum* em 7 e 39 dos surtos não foi possível verificar a espécie presente. Na cidade de Skellefteå, Suécia, o surto ocorreu em abril de 2011 e na cidade de Östersund esse surto foi em novembro de 2010, sendo que neste último somente 186 casos foram testados clinicamente, e a caracterização genética permitiu verificar que a espécie presente em ambos era *C. hominis* (Guzman-Herrador *et al.*, 2015; Hlavsa *et al.*, 2011; Widerström *et al.*, 2014).

Surtos deste parasita são comuns, e como se pode verificar quando os mesmos acontecem bastantes pessoas podem ser afectadas pelo mesmo, podendo vir a trazer consequências fatais para pessoas que sejam imunocomprometidas, sendo assim a criação de medidas preventivas é bastante importante para que se consiga diminuir o número de casos através da diminuição de possíveis fontes de contaminação, melhorando assim a saúde pública.

1.9. Objetivos

A dissertação de mestrado apresentada tem como principais objetivos verificar, através de métodos de deteção microscópicos e/ou moleculares, a presença de *Cryptosporidium* em amostras de água, recolhidas das piscinas do Jardim Zoológico de Lisboa e dos filtros de lavagem das mesmas, e também em amostras de fezes de animais que se encontram no estabelecimento, caracterizando geneticamente o parasita em amostras que demonstrem a presença do mesmo, através da amplificação de genes específicos e posterior sequenciação.

Este trabalho tem também como objetivo tentar perceber se existem infeções cruzadas entre os diferentes animais e aferir quais as possíveis fontes de contaminação existentes, de maneira a poder arranjar soluções para minimizar o risco de infeções para os animais ou mesmo, no caso de espécies zoonóticas, para os seres humanos que lidam com esses animais diariamente.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

2.1.1. Amostras de Água

Para a obtenção das amostras, foram filtrados e concentrados, no dia 6 e 7 de Dezembro de 2016, 100 L de água de duas piscinas do Jardim Zoológico: a piscina do Delfinário (ponto A) e da piscina da Lagoa (ponto B), e 20 L de 3 filtros de lavagem das mesmas, 2 da Piscina do Delfinário (pontos C e D) e 1 da Piscina da Lagoa (ponto E) (Figura 2.1). As amostras foram mantidas refrigeradas (5 ± 3 °C) até à sua filtração e eluição.



Figura 2.1 - Imagem com a localização dos pontos de recolha das amostras de água. A – Piscina do Delfinário, B – Piscina da Lagoa, C - Filtro de Lavagem 3 da Piscina do Delfinário, D – Filtro de Lavagem 1 da Piscina do Delfinário, E – Filtro de Lavagem da Piscina da Lagoa

2.1.2. Amostras de Fezes

Foram recolhidas 137 amostras de fezes, pertencentes a várias famílias de animais (Mamíferos e Répteis) de Outubro de 2016 a Abril de 2017 (Tabela 2.1). As amostras foram colhidas para frascos de colheita estéreis, devidamente identificados, tendo sido colocados a 4 °C até ao processo de concentração.

Tabela 2.1 - Número de amostras recolhidas por família de animais

Família	Número de animais
Agamidae	4
Ailuridae	1
Atelidae	2
Boidae	12
Bovidae	29
Callitrichidae	9
Camelidae	3
Cebidae	2
Cercopithecidae	8
Cervidae	4
Chamaeleonidae	2
Colubridae	6
Elephantidae	6
Emydidae	1
Equidae	1
Felidae	9
Giraffidae	6
Helodermatidae	1
Hippopotamidae	1
Hominidae	10
Hylobatidae	2
Lemuridae	7
Myrmecophagidae	2
Phascolarctidae	1
Procyonidae	1
Pythonidae	1
Testudinidae	2
Ursidae	3
Varanidae	1
	137

2.2. Filtração e Concentração das Amostras de Água

A filtração da água das piscinas foi feita no local, através de filtros Pall Envirochek (Pall Corporation, EUA), com o auxílio de uma bomba peristáltica Easy Load II (Cole Parmer, EUA). A filtração da água dos filtros de lavagem foi feita no laboratório, usando os mesmos materiais, tendo a água sido transportada em garrações de 20 L.

Para a concentração das amostras, a água que se encontrava dentro dos filtros foi transferida para tubos de centrífuga 50 mL (Greiner Bio-One, Áustria) e centrifugada a 11000 G durante 15 min, numa Centrífuga Eppendorf 5804 (Eppendorf, Alemanha).

Os filtros foram eluídos com um tampão de eluição, conforme proposto pela Pall Corporation, constituído por 1 g de Laureth-12, 10 mL de 1M Tris (pH 7,4), 2 mL de 0,5 M EDTA 2 Na (pH 8), 150 µL de anti-espuma A em 1 L água desionizada. O tampão de eluição foi colocado dentro do filtro, até este estar completamente submerso, e colocado em agitação por 1 h e posteriormente para tubos de centrífuga 50 mL (Greiner Bio-One, Áustria), procedendo de seguida à sua centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após a centrifugação o pellet, proveniente de ambas as centrifugações, foi transferido para um único tubo de centrífuga de 50 mL, o qual se per fez até aos 10 mL com água estéril.

Dos 10 mL foi retirado, para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, 1 mL para se proceder à extracção de DNA, o qual foi colocado a -80 °C.

2.3. Preparação das Amostras de Fezes

2.3.1. Método de Sedimentação Difásica de Ritchie Modificado

A preparação das amostras de fezes inicia-se com a sua dissolução e filtração para remoção de detritos de maiores dimensões. A cada amostra foi adicionada água desmineralizada até à sua dissolução, para permitir que fosse filtrada. Filtrou-se, com o uso de gaze e funil cada amostra recolhida, sendo que foram recolhidos 2 mL de amostra filtrada para um tubo de centrífuga de 15 mL (VWR, EUA).

Para a remoção das gorduras das fezes foram adicionados 4 mL de Éter Dietílico ao tubo, foi agitado em vórtex M2 mini shaker (IKA, Alemanha) durante 15 s e posteriormente centrifugado a 1500 rpm por 5 min. A centrífuga utilizada foi Rotina 380 (Hettich, Alemanha).

Da centrifugação resultaram várias fases, tendo-se descartado, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, a fase superior que continha um anel com detritos provenientes da amostra, uma fase que continha o éter e as gorduras e também um pequeno anel entre o éter e o sobrenadante. Ao sobrenadante e ao *pellet*, que constituíam as restantes fases provenientes da centrifugação, foi adicionada água desmineralizada até perfazer 12 mL. Nova centrifugação foi realizada a 4500 rpm durante 10 min.

Descartou-se novamente o sobrenadante, e o *pellet* resultante foi utilizado para a coloração microscópica de Ziehl-Neelsen Modificada (10 µL) e o restante foi colocado a Dicromato de potássio a 2,5 %, até perfazer o tubo de microcentrifuga de 2 mL, para que houvesse a sua conservação até se proceder à extração de ácidos nucleicos e posteriores técnicas moleculares.

2.3.2. Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada das Amostras de Fezes

Para preparação de um esfregaço de fezes, foram pipetados para uma lâmina de vidro de microscopia cerca de 10 µL do *pellet* resultante da segunda sedimentação e deixado ao ar até estar completamente seco. A lâmina foi colocada num suporte e o esfregaço foi fixada com Álcool Metílico durante 5 min, após o qual se aqueceu a lâmina sob o bico de Bunsen, até evaporação do mesmo.

De seguida cobriu-se a lâmina com o corante Fucsina de Ziehl-Neelsen durante 15 min, lavando-se posteriormente com Álcool Clorídrico a 5 %, até a lâmina ficar incolor, e depois com água destilada. Cobriu-se *a posteriori* a lâmina com solução de Azul de Metileno a 1 % durante 2 min, lavou-se com água destilada e deixou-se secar ao ar.

As lâminas foram visualizadas no microscópio Eclipse E400 (Nikon, EUA), utilizando a objetiva de 40x e a de 100x. Para a visualização da objetiva de 100x utilizou-se óleo de imersão.

2.4. Extração e Purificação de Ácidos Nucleicos

2.4.1. Otimização do Protocolo Extração de Ácidos Nucleicos

Foram comparadas duas técnicas de extração de DNA, ambas baseadas no congelamento e descongelamento das amostras de modo a determinar em qual existe maior recuperação de DNA de *Cryptosporidium*. Para o processo de otimização de extração, 200 µL de uma suspensão de oocistos de *Cryptosporidium parvum* (aproximadamente $1,132 \times 10^5$ oocistos/ mL) (Moredun Scientific, Reino Unido), foram inoculados em 2 mL de água residual, previamente verificada como sendo negativa para a presença deste organismo. Após a sua homogeneização foram feitas 4 alíquotas de 200 µL, usando-se 2 para cada metodologia. Uma das metodologias consistiu na realização de 5 ciclos de congelamento e descongelamento, 30 min cada, entre -80 °C e 56 °C, e uma segunda metodologia de 3 ciclos, 5 min cada, usando como temperaturas -80 °C e 97 °C (Robinson, 2005). O método que obteve melhores resultados na extração foi posteriormente utilizado para as amostras de água e de fezes.

2.4.2. Otimização da Purificação de Ácidos Nucleicos das Amostras de Água

Diferentes procedimentos de purificação de DNA, em amostras de água, foram estudados, de maneira a obter melhores resultados na detecção de *Cryptosporidium* por PCR.

A purificação das amostras foi efectuada utilizando dois *kits* de purificação diferentes: Qiagen DNA mini Kit e Qiagen DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Alemanha).

Foi seguido o protocolo referente a cada *kit* descrito pela Qiagen. Ambos os protocolos requerem 200 µL de amostra, a qual foi colocada num tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Igualmente, ambos os protocolos vão dividir-se em fases similares, sendo que as diferenças entre ambos se vão verificar a nível dos reagentes utilizados ou a nível de diferenças na temperatura e tempo de incubação.

Os *kits* têm por base, inicialmente a lise do microrganismo, sendo os ácidos nucleicos precipitados e purificados posteriormente. Os contaminantes celulares são retirados através de passos de lavagem. Como passo final os ácidos nucleicos já purificados são eluídos. As amostras purificadas são colocadas a -80 °C até à realização das restantes técnicas moleculares.

2.4.3. Purificação de Ácidos Nucleicos das Amostras de Fezes

Como primeiro passo, procedeu-se à lavagem das amostras para se retirar o Dicromato de Potássio a 2,5 % das mesmas. Para tal realizaram-se três centrifugações a 12000 rpm durante 10 min cada. Após a primeira e segunda centrifugação retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de PBS, na terceira o sobrenadante também foi retirado, mas adicionou-se somente 200 µL. As amostras foram colocadas a -80 °C até ao processo de extração.

Para a purificação das amostras foi utilizado novamente um *kit*, sendo que para este tipo de matriz utilizou-se o QIAamp Fast DNA Stool Kit (Qiagen, Alemanha), tendo sido usado o protocolo “Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection”.

As amostras obtidas para este processo apresentavam-se no estado líquido, e sendo assim foi utilizado 200 µL de amostra para este processo. Todo o processo decorreu recorrendo às mesmas fases referidas em 2.4.2., desde a lise até à eluição da amostra.

O filtrado proveniente da eluição foi colocado a -80 °C até à realização das restantes técnicas moleculares.

2.5. Detecção de *Cryptosporidium* por Técnicas Moleculares

2.5.1. Otimização do Protocolo de Amplificação

A otimização do protocolo de PCR, de maneira a torná-lo mais sensível e específico, foi realizada em três fases: Teste de diferentes temperaturas de emparelhamento com os três conjuntos de *primers* escolhidos (JVA, CRU18S e COWP), comprovação dos resultados obtidos pelo método de PCR Quantitativo em Tempo Real e finalmente otimização do protocolo de PCR Quantitativo em Tempo Real.

2.5.1.1. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Convencional

No método de PCR Convencional para um volume de reação de 25 µL foram utilizados 12,5 µL de Master Mix Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1 µL de cada um dos *primers*, que estavam a uma concentração de 100 µM, 5,5 µL de água e 5 µL de amostra, e foi utilizado o termociclador Applied Biosystems Veriti (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Foram testados três conjuntos de *primers* JVA e CRU18S, que têm como alvo o 18S rRNA, e o COWP que têm como alvo uma proteína da parede dos oocistos de *Cryptosporidium* (Tabela 2.2) (Hill *et al.*, 2007; Hadfield *et al.*, 2011; Guy *et al.*, 2003).

Tabela 2.2 - Conjunto de *primers* utilizados na Amplificação dos genes 18S rRNA e COWP por PCR Convencional.

Primer	Alvo	Sequência (5' – 3')	Referência
Jva18S_F	18S rRNA	ATG ACG GGT AAC GGG GAA T	(Hill <i>et al.</i> , 2007)
Jva18S_R		CCA ATT ACA AAA CCA AAA AGT CC	(Hill <i>et al.</i> , 2007)
CRU18S_F	18S rRNA	GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT ACA GG	(Hadfield <i>et al.</i> , 2011)
CRU18s_R		CTG CTT TAA GCA CTC TAA TTT TCT CAA AG	(Hadfield <i>et al.</i> , 2011)
COWP_P702F	COWP	CAA ATT GAT ACC GTT TGT CCT TCT G	(Guy <i>et al.</i> , 2003)
COWP_P702R		GGC ATG TCG ATT CTA AAT CAG CT	(Guy <i>et al.</i> , 2003)

Cada conjunto de *primers* foi submetido a diferentes temperaturas de emparelhamento, as quais foram 55 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C e 61 °C, sendo que, para cada temperatura foram usadas amostras provenientes de diluições seriadas de 1:10 de DNA, com concentrações variando entre 10³ a 10⁻¹ cg/ mL, em que o mesmo foi extraído de uma suspensão de oocistos de um controlo positivo de *Cryptosporidium parvum* (aproximadamente 1,132x10⁵ oocistos/ mL) (Moredun Scientific, Reino Unido).

O protocolo usado foi 1 ciclo de 95 °C durante 1 min, 35 ciclos a 95 °C durante 15 s, uma das temperaturas de emparelhamento referenciadas anteriormente durante 15 s e 72 °C durante 15 s e, por último, 1 ciclo a 72 °C por 7 min.

Após a técnica de PCR Convencional os produtos resultantes da PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (2,5 %) a 65 V. Para este processo foram utilizados 8 µL de cada amostra e 2 µL de *Loading Buffer*. Ao primeiro poço do gel de agarose foi adicionado um Marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (New England Biolabs Inc., Inglaterra). Posteriormente à electroforese o gel de agarose foi colocado em brometo de etídeo durante 10 min, sendo depois visualizados num transiluminador (UVITEC, Reino Unido).

2.5.1.2. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Quantitativo em Tempo Real

Para este procedimento foram utilizados os mesmos três conjuntos de *primers* referenciados no ponto 2.5.1.1., e foi usada uma concentração de 10⁵ cg/ mL de DNA extraído do controlo previamente referido. As sondas utilizadas para este procedimento podem ser visualizadas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Conjunto de sondas utilizadas na Amplificação dos genes 18S rRNA e COWP por PCR Quantitativo em Tempo Real.

Sonda	Alvo	Sequência (5' – 3')	Referência
Jva18S_P	18S rRNA	CGC GCC TGC TGC CTT CCT TAG ATG	(Hill <i>et al.</i> , 2007)
CRU18S_P	18S rRNA	TAC GAG CTT TTT AAC TGC AAC AA	(Hadfield <i>et al.</i> , 2011)
COWP_P702P	COWP	ATT CAA TTT GTC AGG ACA ACA ATG TAT GGC A	(Guy <i>et al.</i> , 2003)

O protocolo seguido foi 1 ciclo a 50 °C durante 2 min, 1 ciclo a 95 °C por 10 s e 40 ciclos a 95 °C por 15 s mais 60 °C durante 1 min.

Como reagentes para este processo foram utilizados 12,5 µL de Taq Man Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,2 µL de ambos os *primers* (concentração de 100 mM), 0,05 µL de Sonda (concentração de 100 µM), 7,05 µL de água e 5 µL de amostra, para cada reação, e foi utilizado para a realização do método de PCR Quantitativo em Tempo Real o Sistema de PCR em Tempo Real 7300 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.5.1.3. Avaliação de Protocolos para PCR Quantitativo em Tempo Real

O conjunto de *primers*, com qual se obteve maior sensibilidade nos procedimentos descritos anteriormente, foi submetido a um método de PCR Quantitativo em Tempo Real utilizando-se dois protocolos diferentes, para se verificar qual teria maior sensibilidade. Para este procedimento utilizaram-se diluições seriadas de 1:10 de DNA, com concentrações variando entre 10^5 a 10^{-1} cg/ mL, do controlo positivo extraído previamente, referido em 2.5.1.1., sendo que os reagentes e as quantidades utilizadas de cada um, foram as descritas em 2.5.1.2.

O Protocolo 1 utilizado consistiu em 1 ciclo inicial a 95 °C durante 7 s, 47 ciclos a 95 °C por 5 s e 60 °C por 40 s e 1 ciclo final a 40 °C durante 30 s. As condições do protocolo 2 foram descritas por Vicent Hill (2007), mas utilizado neste trabalho com modificação: 1 ciclo a 95 °C durante 15 s e 45 ciclos a 94 °C por 10 s, 55 °C por 30 s e 72 °C durante 20 s.

As amostras de água e fezes foram analisadas através do protocolo que apresentou melhores resultados.

2.6. Caracterização Genética de *Cryptosporidium*

Após a realização do método de PCR Quantitativo em Tempo Real, todas as amostras que obtiveram resultados positivos foram sujeitas a uma caracterização genética, de maneira a verificar se existia mais do que uma espécie do parasita nas mesmas e qual, ou quais, a(s) espécie(s) presente(s) nas amostras.

Os genes selecionados, para a realização da detecção e diferenciação, foram o 18S rRNA, com o qual se realizou uma PCR seguido de distinção de espécies por RFLP e o gene *gp60*, em que se realizou sequenciação a partir do amplificado de DNA obtido. Para ambos os procedimentos foi utilizada a amplificação através de *Nested*-PCR, o qual permite que haja um aumento da sensibilidade do processo. O gene 18S rRNA permite o diagnóstico das espécies que se encontram nas amostras, e o gene *gp60* permite a realização de uma subtipagem de *C. parvum* e *C. hominis* (Jenkins *et al.*, 2015; Sulaiman *et al.*, 2005).

2.6.1. Detecção e Diferenciação de *Cryptosporidium* através do Gene 18S rRNA

O método utilizado foi descrito por Xiao *et al.*, 2001 e consiste numa primeira amplificação de uma sequência de DNA do gene 18S rRNA, com aproximadamente 1325 pb, seguido de uma segunda amplificação de uma sequência, dentro da primeira, com cerca de 820 pb.

Para a realização da primeira PCR foi utilizado 25 µL de Master Mix (Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,5 µL de cada um dos *primers*

(Tabela 2.4), com uma concentração de 20 µM, 19 µL de água e 5 µL de amostra, tendo como volume final de reacção 50 µL. Como controlo positivo utilizou-se DNA de *C. parvum*.

O protocolo utilizado no Termociclador Applied Biosystems Veriti (Thermo Fisher Scientific, EUA) foi de 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 55 °C por 45 s e 72 °C durante 1 min, tendo-se realizado 1 ciclo inicial do protocolo a 94 °C durante 3 min e um passo final de extensão de 1 ciclo a 72 °C por 7 min.

A segunda PCR foi executado com os mesmos reagentes, quantidades e protocolo supra referidos, amplificando-se 5 µL do produto proveniente da primeira PCR.

Tabela 2.4 - Conjunto de *primers* utilizados na detecção e diferenciação de *Cryptosporidium* através do gene 18S rRNA.

Primer	Alvo		Sequência (5' – 3')	Referência
CrySSU1	18S rRNA	1ª PCR	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG	(Xiao <i>et al.</i> , 2001)
CrySSU2			CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA	(Xiao <i>et al.</i> , 2001)
CrySSU3		2ª PCR	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	(Xiao <i>et al.</i> , 2001)
CrySSU4			AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A	(Xiao <i>et al.</i> , 2001)

Após o método de *Nested*-PCR, foi realizada uma digestão do produto proveniente da segunda PCR com recurso a duas enzimas, SspI e VspI (New England Biolabs e Thermo Fisher Scientific, EUA respetivamente) para diagnóstico de espécies para genotipagem de *C. parvum*. Foi utilizado 20 µL do produto da segunda PCR, 20 U da enzima (SspI ou VspI) e 5 µL do tampão da enzima apropriado, sendo o volume final da reacção de 50 µL. A digestão enzimática foi realizada durante 2 h a 37 °C para ambas as enzimas (Royer *et al.*, 2002).

O produto proveniente da digestão foi de seguida colocado num gel de agarose a 2,5 %, realizando-se uma electroforese a 65 V durante 2 h. Para este processo também foram utilizados 8 µL de cada amostra e 2 µL de *Loading Buffer*, tendo sido adicionado ao primeiro poço do gel de agarose um Marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (New England Biolabs Inc., Inglaterra). Posteriormente o gel foi visualizado num transiluminador (UVITEC, Reino Unido), após ter sido revelado com brometo de etídeo.

O gel, após esta primeira visualização, foi novamente visualizado utilizando o G:Box (Syngene, Reino Unido), tendo as bandas sido analisadas pelo programa Gene Tools (Syngene, Reino Unido).

Após a visualização dos resultados obtidos as amostras que porventura fossem caracterizadas como sendo *C. parvum* ou *C. hominis*, seriam analisadas através do gene *gp60*, para fazer a tipificação da espécie. As amostras com resultados positivos, para espécies que não as referidas anteriormente, foram enviadas para sequenciação, na Universidade de Dundee, de maneira a confirmar os resultados obtidos ou para permitir realizar uma identificação de possíveis amostras em que não fosse possível a identificação com recurso a literatura.

2.6.2. Detecção e Diferenciação de *Cryptosporidium* através do Gene *gp60*

O método utilizado para realizar a detecção e diferenciação através do gene *gp60* permite amplificar um fragmento de 450 pb desse mesmo gene, sendo que tal foi também realizado um método de *Nested-PCR*.

O gene *gp60* foi amplificado utilizando 25 µL de Master Mix (Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,5 µL de cada um dos *primers* (Tabela 2.5), com uma concentração de 100 µM, 19 µL de água e 5 µL de amostra ou produto da primeira PCR, tendo como volume final de reacção 50 µL. Foi utilizado o Termociclador Applied Biosystems Veriti (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Tabela 2.5 - Conjunto de *primers* utilizados na detecção e diferenciação de *Cryptosporidium* através do gene *gp60*.

Primer	Alvo		Sequência (5' – 3')	Referência
GP60-F1	<i>gp60</i>	1ª PCR	ATA GTC TCC GCT GTA TTC	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2005)
GP60-R1			GAG ATA TAT CTT GGT GCG	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2005)
GP60-F2		2ª PCR	TCC GCT GTA TTC TCA GCC	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2005)
GP60-R2			CGA ACC ACA TTA CAA ATG AAG T	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2005)

O protocolo utilizado para a amplificação consistiu em 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 50 °C por 45 s e 72 °C durante 1 min, tendo-se realizado 1 ciclo inicial do protocolo a 94 °C durante 5 min e um passo final de extensão de 1 ciclo a 72 °C por 10 min.

O produto proveniente da segunda PCR foi enviado para sequenciação na Universidade de Dundee.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise Microscópica por Coloração Ziehl-Neelsen Modificada

Das 137 amostras analisadas (Anexo 1) a análise microscópica das amostras fecais permitiu verificar a existência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 32 amostras (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Número de Espécies/Subespécies de animais com amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. por Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada, comparando com o número de amostras totais observadas.

	Nome Comum	Espécie/Subespécie	Número de amostras positivas por espécie/subespécie
Artiodactyla	Búfalo Africano	<i>Syncerus caffer caffer</i>	1/3
	Camelo Bactriano Selvagem	<i>Camelus ferus</i>	1/2
	Dromedário	<i>Camelus dromedarius</i>	1/1
	Elande	<i>Tragelaphus oryx</i>	2/2
	Girafa de Angola	<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>	2/3
	Impala de Face Negra	<i>Aepyceros melampus petersi</i>	1/1
	Niala	<i>Tragelaphus angasii</i>	1/1
	Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>	1/3
	Órix da Arábia	<i>Oryx leucoryx</i>	2/2
	Órix de Cimitarra	<i>Oryx dammah</i>	1/2
	Sitatungas	<i>Tragelaphus spekii</i>	1/1
	Pacaça	<i>Syncerus caffer nanus</i>	1/1
	Palanca Negra	<i>Hippotragus niger niger</i>	2/3
	Palanca Ruana	<i>Hippotragus equinus</i>	1/3
Carnivora	Lince Euroasiático	<i>Lynx lynx</i>	1/1
Chelonia	Tartaruga Espinhosa	<i>Heosemys spinosa</i>	1/1
Primates	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	3/6
	Langur de Java	<i>Trachypithecus auratus</i>	1/1
	Lémure de Fronte Branca	<i>Eulemur fulvus albifrons</i>	1/1
	Lémure Preto e Branco de Colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	1/2
Perissodactyla	Zebra de Grevy	<i>Equus grevyi</i>	1/1
Proboscidea	Elefante Africano	<i>Loxodonta africana</i>	1/6
Squamata	Anaconda Amarela	<i>Eunectes notaeus</i>	1/2
	Cobra Falsa Coral	<i>Lampropeltis triangulum</i>	1/2
	Pitão de Cheyney	<i>Morelia spilota cheynei</i>	1/2
	Pitão Real	<i>Phyton regius</i>	1/2

Das várias ordens analisadas a que apresentou maior número de animais infetados foi a Artiodactyla com 18 positivos em 43 animais analisados, seguida pelas ordens Primates com 6 positivos em 40 e Squamata com 4 em 27 (Gráfico 3.1).

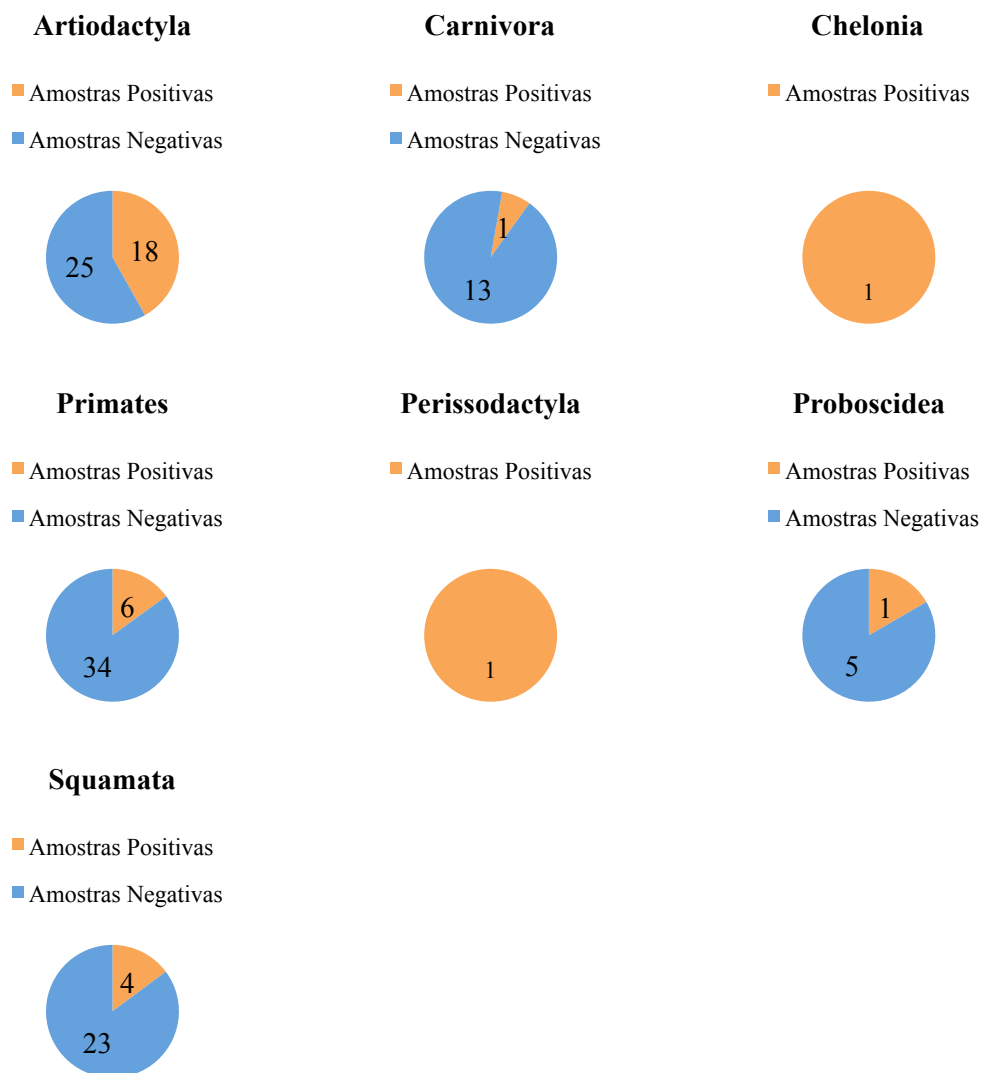


Gráfico 3.1 - Comparação do número de animais positivos e negativos para a presença de *Cryptosporidium* spp. por Coloração Ziehl-Neelsen Modificada.

Nenhuma amostra apresentou um elevado número de oocistos, o que era espectável devido a nenhum animal apresentar sintomas da presença do parasita (Figura 3.1).

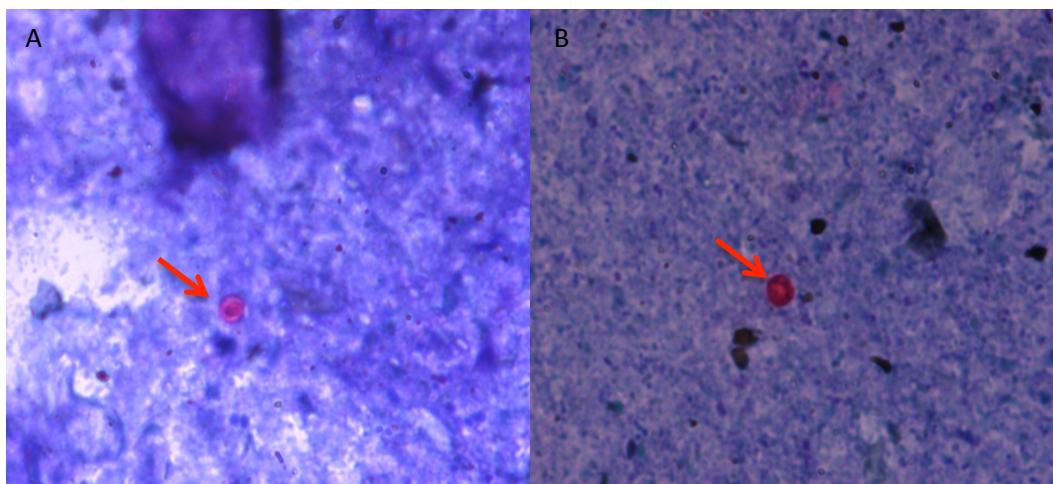


Figura 3.1 - Fotografia de duas amostras positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. através de análise por Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada a 100x. A – Amostra 26 (Girafa de Angola); B – Amostra 94 (Zebra de Grevy).

3.2. Otimização da Extração e Purificação de ácidos nucleicos

Após a realização de todos os procedimentos que constituem a extração e purificação dos ácidos nucleicos, ou seja, extração de *Cryptosporidium* através dos dois protocolos diferentes de ciclos de congelamento e descongelamento, 5 ciclos de congelamento e descongelamento, 30 min cada, entre -80 °C e 56 °C (método de extração 1), e uma segunda metodologia de 3 ciclos, 5 min cada, usando como temperaturas -80 °C e 97 °C (método de extração 2), e do uso de dois kits diferentes, Qiagen DNA mini Kit e Qiagen DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Alemanha), foi possível observar que se conseguiu melhores resultados utilizando o método de extração 1, o qual se utilizou para ambos os tipos de amostras analisadas no estudo. No caso das amostras de água este procedimento de extração foi complementado com a utilização do kit de extração e purificação Qiagen DNA mini Kit (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Resultados obtidos por PCR Quantitativo em Tempo Real da otimização do método de extração e purificação de *Cryptosporidium*, utilizando como inóculo inicial uma concentração de 10^5 oocistos/ mL.

	Quantificação (cg/ mL)
Amostra inicial (sem inóculo)	-
Amostra com <i>Cryptosporidium</i> (método extração 1)	4,36E+02
Amostra com <i>Cryptosporidium</i> (método extração 2)	3,80E+02
Purificação com Qiagen DNA mini Kit (método extração 1)	9,80E+03
Purificação com Qiagen DNA mini Kit (método extração 2)	8,86E+02
Purificação com Qiagen DNeasy Plant mini Kit (método extração 1)	1,31E+03
Purificação com Qiagen DNeasy Plant mini Kit (método extração 2)	9,68E+02

Neste procedimento a amostra foi analisada em várias fases da metodologia para se verificar que não havia a existência de *Cryptosporidium* na amostra inicial, a ser utilizada para este processo, e também onde poderiam ocorrer as perdas ou melhorias na eficácia do procedimento.

Os resultados permitem observar que existe sempre uma maior recuperação quando se utilizou o método de extração 1 em comparação com o método 2, mesmo após a utilização dos dois *kits* de purificação. Realizando uma comparação entre os melhores resultados obtidos, os quais foram ambos com o método de extração 1 mas utilizando os *kits* de purificação diferentes, verificou-se que a diferença de ambos ainda era significativa apresentando uma recuperação de aproximadamente 13,6 % menor com o Qiagen DNeasy Plant mini Kit quando comparado com o Qiagen DNA mini Kit (Qiagen, Alemanha).

Verificou-se a existência de maior recuperação após a utilização dos *kits* de purificação quando comparada com a realização da metodologia sem que este processo ocorra. Este aumento de recuperação pode dever-se à purificação das amostras a que é submetido, que ajuda a eliminar possíveis inibidores de PCR presentes, tornando o método de PCR Quantitativo em Tempo Real mais eficiente.

3.3. Detecção de *Cryptosporidium* por Técnicas Moleculares

3.3.1. Otimização do Protocolo de Amplificação

3.3.1.1. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Convencional

Na otimização realizada ao método de PCR, utilizando PCR Convencional e os três conjuntos de primers, JVA, CRU18S e COWP, submetidos a temperaturas e concentrações diferentes de *Cryptosporidium*, verificou-se que se obteve uma sensibilidade maior com o conjunto de primers JVA. Tal facto é justificado pela existência de amplificação a uma temperatura de emparelhamento de 55 °C e a uma concentração de 10², que não é detetada com os restantes conjuntos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Resultados obtidos por PCR Convencional para os conjuntos de *primers* JVA, CRU18S e COWP nas diferenças temperaturas e concentrações de diluições seriadas de 1:10, com concentrações variando entre 10^3 a 10^{-1} cg/ mL, de DNA de *Cryptosporidium parvum*.

	55 °C					57 °C					58 °C					59 °C					60 °C					61 °C				
	10^3	10^0	10^1	10^2	10^5	10^1	10^0	10^1	10^2	10^5	10^1	10^0	10^1	10^2	10^5	10^1	10^0	10^1	10^2	10^5	10^1	10^0	10^1	10^2	10^5	10^1	10^0	10^1	10^2	10^5
JVA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
CRU18S	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
COWP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

3.3.1.2. Amplificação dos Genes 18S rRNA e COWP por PCR Quantitativo em Tempo Real

Posteriormente à amplificação pela técnica de PCR Convencional, procedeu-se à realização de um método de PCR Quantitativo em Tempo Real utilizando os mesmos conjuntos *primers*.

Os resultados obtidos permitiram verificar que o conjunto de *primers* JVA era o que continuava a apresentar maior sensibilidade, exibindo um *Cycle Threshold* inferior ao apresentado pelos outros conjuntos, sendo portanto o conjunto escolhido para efectuar o restante trabalho (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Resultados de *Cycle Threshold* obtidos por PCR Quantitativo em Tempo Real para os conjuntos de *primers* JVA, CRU18S e COWP, utilizando a concentração 10^5 cg/ mL de DNA de *Cryptosporidium parvum*.

	<i>Cycle Threshold</i>
JVA	23,6186
CRU18S	34,4448
COWP	27,437

3.3.1.3. Avaliação de Protocolos para PCR Quantitativo em Tempo Real

Após a verificação de que o conjunto de *primers* JVA apresentava melhores resultados, estes foram submetidos a dois protocolos diferentes para verificar qual o que apresentava maior sensibilidade.

Tabela 3.5 - Resultados de *Cycle Threshold* obtidos por PCR Quantitativo em Tempo Real nos dois protocolos analisados, utilizando diluições seriadas de 1:10 de DNA de *Cryptosporidium parvum*, com concentrações variando entre 10^5 a 10^{-1} cg/ mL, utilizando o conjunto de *primers* JVA.

	<i>Cycle Threshold</i>							
	H ₂ O	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	10^{-1}
Protocolo 1	-	40,3302	32,4418	34,9462	38,0132	-	-	-
Protocolo 2	-	22,1762	25,3741	29,4779	33	34,4986	-	-

O protocolo que apresentou melhores resultados foi o protocolo 2, o qual obteve maior sensibilidade, apresentando detecção de *Cryptosporidium* até à concentração 10^1 cg/ mL, enquanto o protocolo 1 só obteve resultados até à concentração de 10^2 cg/ mL (Tabela 3.5).

É possível verificar que o *Cycle Threshold* apresentado pela concentração 10^5 cg/ mL do protocolo 1, se encontra bastante alto em comparação com os restantes, esta anomalia poderá dever-se a algum erro na preparação da amostra. A partir dos resultados obtidos, o protocolo escolhido para realizar durante a análise das amostras foi o protocolo 2.

3.4. Análise das Amostras de Fezes por PCR Quantitativo em Tempo Real

A análise pelo método de PCR Quantitativo em Tempo Real das amostras de fezes permitiu verificar que das 137 amostras analisadas, 19 obtiveram resultados positivos.

Das 19 amostras positivas, a ordem que apresentou maior número de positivos foi a Squamata com 10 positivos em 27 amostras analisadas, seguida pela ordem Artiodactyla e Primates, com 4 positivos em 43 e 2 positivos em 40, respetivamente (Gráfico 3.2).

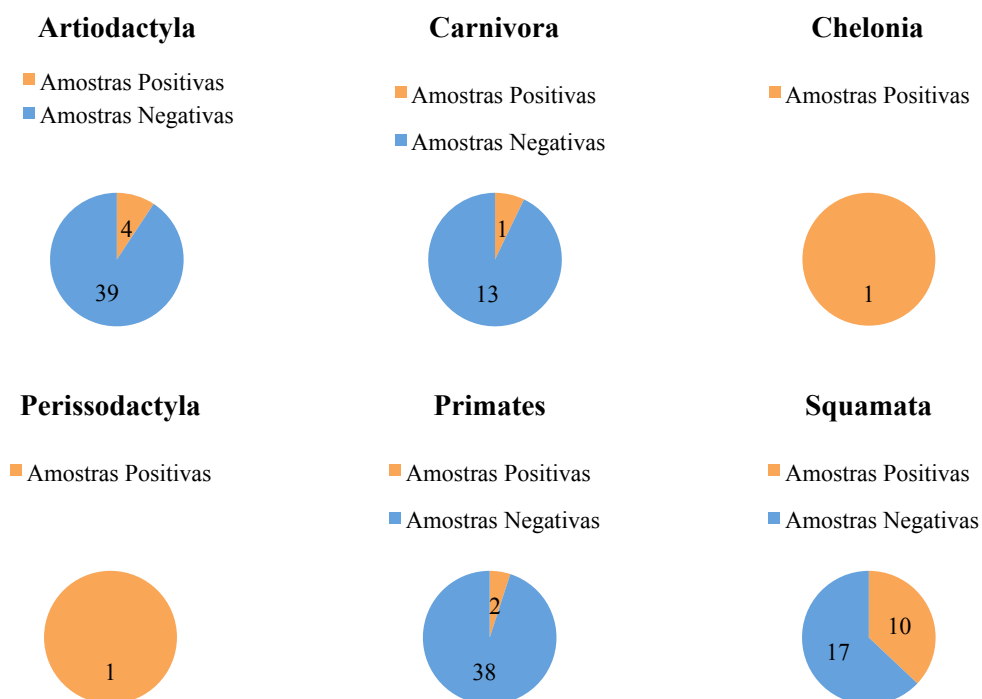


Gráfico 3.2 – Comparação do número de animais positivos e negativos para a presença de *Cryptosporidium* spp. por PCR Quantitativo em Tempo Real.

Todas as amostras foram quantificadas, permitindo verificar que quase todas as amostras de animais não apresentavam valores muito altos, o que já era espectável como referido em 3.1. (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Animais cujas amostras de fezes foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. e número de cópias do genoma, determinadas por PCR Quantitativo em Tempo Real.

	Número Amostra	Nome Comum	Espécie/Subespécie	Quantificação (cg/ mL)
Artiodactyla	29	Camelo Bactriano Selvagem	<i>Camelus ferus</i>	3,27E+01
	30	Impala de Face Negra	<i>Aepyceros melampus petersi</i>	8,40E+01
	52	Órix da Arábia	<i>Oryx leucoryx</i>	2,64E+03
	53	Órix da Arábia	<i>Oryx leucoryx</i>	4,98E+01
Carnivora	7	Leopardo Pérsia	<i>Panthera pardus saxicolor</i>	2,91E+02
Chelonia	127	Tartaruga Espinhosa	<i>Heosemys spinosa</i>	6,85E+00
Perissodactyla	94	Zebra de Grevy	<i>Equus grevyi</i>	1,15E+01
Primates	10	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	7,56E+00
	20	Langur de Java	<i>Trachypithecus auratus</i>	2,25E+00
Squamata	125	Camaleão do Iémen	<i>Chamaeleo calytratus</i>	9,85E+01
	123	Cobra Falsa Coral	<i>Lampropeltis triangulum</i>	4,47E+02
	132	Cobra Falsa Coral	<i>Lampropeltis triangulum</i>	1,54E+03
	118	Cobra do Milho	<i>Pantherophis guttatus</i>	9,17E+01
	110	Pitão de Cheyney	<i>Morelia spilota cheynei</i>	3,29E+03
	111	Pitão de Cheyney	<i>Morelia spilota cheynei</i>	2,61E+02
	136	Pitão Real	<i>Python regius</i>	9,83E+01
	137	Pitão Real	<i>Python regius</i>	4,93E+00
	109	Pitão Sanguíneo	<i>Python curtus</i>	6,77E+00
	135	Serpente Rei da Califórnia	<i>Lampropeltis getula californiae</i>	3,35E+00

3.5. Comparação dos Resultados obtidos na Análise por Microscopia e por PCR Quantitativo em Tempo Real das Amostras de Fezes

No decorrer do trabalho observou-se que 40 animais dos 137 analisados apresentavam infecção por *Cryptosporidium* spp., havendo assim uma proporção de prevalência de aproximadamente 29,2% de animais infetados no Jardim Zoológico (Equação 3.1).

$$\text{Proporção de prevalência} = \frac{\text{Número de animais positivos para } \textit{Cryptosporidium} \text{ spp.} \times 100}{\text{Número de animais}} = \frac{40 \times 100}{137} \cong 29,2 \%$$

Equação 3.1. – Equação referente à proporção de prevalência de *Cryptosporidium* spp. nos animais do Jardim Zoológico de Lisboa

Esta proporção de prevalência elevada poderá sugerir a existência de uma infecção crónica nos animais, havendo alguns que funcionam como reservatórios do parasita, mas tal não foi possível confirmar no presente estudo, pois seria necessário fazer uma análise mais exaustiva a todos os animais presentes no estabelecimento, tal como sugerido por Gómez *et al.* (1996).

Das 40 amostras referidas 11 apresentaram positividade tanto na análise microscópica realizada por Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada, como por PCR Quantitativo em Tempo Real, enquanto outras somente apresentaram resultados positivos num dos métodos (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Comparação das amostras de fezes positivas em ambas as metodologia utilizadas na análise de *Cryptosporidium* spp., apresentando-se a vermelho os resultados em que houve concordância em ambas as técnicas.

Número Amostra	Nome Comum	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real
2	Lince Euroasiático	Positivo	Negativo
7	Leopardo Pérsia	Negativo	Positivo
9	Chimpanzé	Positivo	Negativo
10	Chimpanzé	Positivo	Positivo
14	Chimpanzé	Positivo	Negativo
20	Langur de Java	Positivo	Positivo
21	Búfalo Africano	Positivo	Negativo
26	Girafa de Angola	Positivo	Negativo
27	Girafa de Angola	Positivo	Negativo
29	Camelo Bactriano Selvagem	Positivo	Positivo
30	Impala de Face Negra	Positivo	Positivo
31	Órix de Cimitarra	Positivo	Negativo
34	Elande	Positivo	Negativo
35	Elande	Positivo	Negativo
37	Okapi	Positivo	Negativo
39	Palanca Negra	Positivo	Negativo
40	Palanca Negra	Positivo	Negativo
44	Palanca Ruana	Positivo	Negativo
49	Dromedário	Positivo	Negativo
50	Sitatunga	Positivo	Negativo
51	Pacaça	Positivo	Negativo
52	Órix da Arábia	Positivo	Positivo
53	Órix da Arábia	Positivo	Positivo
64	Niala	Positivo	Negativo
79	Lémure de Fronte Branca	Positivo	Negativo
80	Lémure Preto e Branco de Colar	Positivo	Negativo
86	Elefante Africano	Positivo	Negativo
94	Zebra de Grevy	Positivo	Positivo
109	Pitão Sanguíneo	Negativo	Positivo
110	Pitão de Cheyney	Negativo	Positivo
111	Pitão de Cheyney	Positivo	Positivo
118	Cobra do Milho	Negativo	Positivo
123	Cobra Falsa Coral	Positivo	Positivo
125	Camaleão do Iémen	Negativo	Positivo
127	Tartaruga Espinhosa	Positivo	Positivo
130	Anaconda Amarela	Positivo	Negativo
132	Cobra Falsa Coral	Negativo	Positivo
135	Serpente Rei da Califórnia	Negativo	Positivo
136	Pitão Real	Negativo	Positivo
137	Pitão Real	Positivo	Positivo

Em certas espécies/subespécies de animais no qual houve resultados positivos para a presença de *Cryptosporidium* spp.(Tabela 3.7), verificou-se que em algumas delas já tinha sido referido a presença do parasita nas mesmas, mas que em 13 dos animais analisados esta foi a primeira vez a ser verificada a sua presença.

Animais como o Búfalo Africano, Chimpazé, Girafa de Angola, Dromedário, Impala de Face Negra, Zebra, Órix de Cimitarra, Palanca Negra, Pacaça, Elefante Africano, Cobra Falsa Coral, Cobra do Milho, Camaleão do Iémen, Serpente Rei da Califórnia, Pitão de Cheyney e Pitão Real, já tinham sido identificados como hospedeiros de *Cryptosporidium* (Abe & Matsubara, 2015; Gómez *et al.*, 1996; Gonzalez-Moreno *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2016; Hogan *et al.*, 2014; Kimbell III *et al.*, 1999; Mahapatra *et al.*, 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Mtambo *et al.*, 1997; Plutzer & Karanis, 2007; Richter *et al.*, 2011; Samra *et al.*, 2011; Sazmand & Joachim, 2017; Van Winkle, 1985; Yimming *et al.*, 2016).

O Búfalo Africano já foi considerado hospedeiro de *Cryptosporidium* em vários artigos publicados, tendo sido observado como hospedeiro num estudo realizado em 1996, no Jardim Zoológico de Barcelona, e em 1997 em animais de quintas e selvagens do Parque Nacional Mikumi, na região de Morongo, Tanzânia. Neste último artigo referido observou-se a presença do parasita em 36 animais desta espécie, verificando-se que a prevalência do mesmo era superior nos bezerros comparada com os animais com mais de 3 meses e adultos (Gómez *et al.*, 1996; Mtambo *et al.*, 1997).

Também se observou a positividade de *Cryptosporidium* neste animal, num estudo realizado em 2011 no Parque Nacional Kruger, África do Sul, tendo posteriormente sido feita a sua caracterização genética das amostras positivas revelando que as espécies *C. ubiquitum* e *C. bovis* estavam presentes. Ainda num outro estudo, no qual foi proposto uma nova espécie do parasita, *C. proliferatus* n. sp., verificou-se que o Búfalo Africano também poderia ser um possível hospedeiro (Samra *et al.*, 2011, 2013; Kváč *et al.*, 2016).

No artigo supra referido, sobre o estudo realizado no Jardim Zoológico de Barcelona, foi pela primeira vez registado a presença de *Cryptosporidium* na Girafa, sendo que a medição dos oocistos sugeriu que a espécie presente seria *C. parvum*, enquanto que no artigo referente ao Parque Nacional de Mikumi também se verificou a presença do parasita em Zebras, havendo a presença do mesmo em 28 % dos animais, desta espécie, analisados (Gómez *et al.*, 1996; Mtambo *et al.*, 1997).

Também na Girafa, mas noutra subespécie *Giraffa camelopardalis reticulata*, comumente designada por Girafa Reticulada, foi encontrada a presença de *C. muris* num estudo que tinha como objectivo investigar a presença de *Cryptosporidium* em mamíferos exóticos cativos na República Checa (Kodádková *et al.*, 2010).

O Elefante Africano e o Impala também foram considerados hospedeiros de *Cryptosporidium* no artigo relativo ao Parque Nacional de Kruger, referido anteriormente, tendo sido feita a caracterização genética das amostras, permitindo verificar a presença de *C. ubiquitum* nos Impalas, tal como ocorreu no Búfalo Africano, enquanto que não foi possível obter resultados quanto às amostras do Elefante Africano (Samra *et al.*, 2011, 2013).

Também já foi reportado o Chimpanzé em alguns artigos como hospedeiro deste parasita, em locais como Nigéria e ainda em duas regiões diferentes da Tanzânia. O estudo na Nigéria foi realizado em 2011, na região de Calabar, no qual se realizou uma análise aos parasitas gastrointestinais de primatas cativos e selvagens, observando-se que a proporção de infetados era maior nos primatas em cativeiro e

em maior percentagem nas fêmeas e crias (< de 12 meses), tendo-se observado a partir da caracterização genética que a espécie existente era *C. parvum*. Quanto aos estudos realizados na Tanzânia um foi na região de Ugalla, em 2013, sendo que o objetivo do estudo era verificar a prevalência do parasita em diferentes condições ambientais, verificando-se que a prevalência era três vezes maior em que estações com maior precipitação do que em estações mais secas, e o segundo em Gombe, 2015, com amostras provenientes de humanos, animais domésticos e selvagens perto do Parque Nacional de Gombe, observando-se a presença de *C. hominis* e *C. suis* nos Chimpanzés analisados (Gonzalez-Moreno *et al.*, 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Parsons *et al.*, 2015).

No Irão já foram reportados vários casos da presença de *Cryptosporidium* nos Dromedários, tendo desde 1995 a 2016 havido a publicação de 8 artigos sobre o tema. Um dos artigos previamente mencionados foi publicado em 2009 e reporta a presença do parasita em Dromedários no matadouro Najaf-Abad em 39 dos 103 animais analisados. Também na China já foi reportada em 2016 a presença de *Cryptosporidium* neste animal numa investigação realizada num Jardim Zoológico na província de Anhui, em que foi feita a caracterização genética através da técnica PCR-RFLP em que se determinou que a espécie presente era *C. andersoni* (Gu *et al.*, 2016; Razavi *et al.*, 2009; Sazmand & Joachim, 2017).

Quanto ao Pacaça e Palanca Negra, o primeiro foi identificado como hospedeiro do parasita num estudo realizado no Parque Nacional dos Vulcões, Ruanda, que consistiu num estudo para verificar a potencial transmissão de parasitas, *Giardia* e *Cryptosporidium*, aos gorilas das Montanhas, primata em risco de extinção, a partir de outros animais que vivam nas proximidades deste, enquanto que o Palanca Negra foi identificado como hospedeiro num estudo realizado com o intuito de estudar a variabilidade de *Cryptosporidium* em vários hospedeiros através do gene 18S rRNA, em que se verificou a presença de *C. parvum* genótipo de bovino nesta espécie (Hajdušek *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2014).

O Órix de Cimitarra foi considerado hospedeiro do parasita em 1985, num estudo realizado em crias de animais pertencentes à ordem Artiodactyla, encontrando-se o mesmo no trato intestinal deste animal, enquanto que o Niala obteve resultado positivo para a presença do parasita em 2003, realizando-se a caracterização genética do parasita utilizando dois genes, 18S e *hsp-70*, em que se obteve resultado para a presença de *Cryptosporidium* genótipo de cervídeos nas amostras recolhidas deste animal (Ryan *et al.*, 2003; Van Winckle, 1985).

No Leopardo da Pérsia (*Panthera pardus*) já foi detetada a presença de *C. parvum* genótipo de rato, num estudo realizado em 2007, em que se executou a caracterização molecular de amostras provenientes de animais da província de Qinghai, China (Karanis *et al.*, 2007).

Num artigo escrito por Yimming *et al.*, em 2016, que teve como objetivo a identificação de espécies de *Cryptosporidium* em cobras que se podem encontrar à venda em lojas exóticas, na Tailândia. Neste estudo foi utilizado duas técnicas de análise, Coloração Dimetilsulfóxido *acid-fast* modificado e o método molecular PCR-RFLP, utilizando o gene 18S rRNA como alvo, para analisar geneticamente as amostras positivas. Neste estudo verificou-se a presença do parasita em répteis como a Cobra do Milho, Cobra Falsa Coral, Serpente Rei da Califórnia Pitão de Cheyney e Pitão Real. A técnica molecular utilizada permitiu verificar a presença de *C. parvum* genótipo de rato, *C. serpentis* e *C. saurophilum* (atualmente designada por *C. varanii*) na Cobra do Milho, *C. parvum* genótipo de rato na Cobra Falsa Coral, *C. serpentis* na Serpente Rei da Califórnia, *C. parvum* genótipo de rato e *C. andersoni* na Pitão de Cheyney e por último na Pitão Real a apresentava a presença de *C. parvum*.

genótipo de rato, *C. muris* e *Cryptosporidium* genótipo de rato (Pavlassek & Ryan, 2008; Yimming *et al.*, 2016).

A primeira vez que foi verificado que a Cobra do Milho era hospedeira de *C. saurophilum*, foi em 2007, após uma análise às fezes de duas cobras adultas que apresentavam sintomas, como diarreia e regurgitação persistente, tendo-se realizado a examinação por Coloração Ziehl-Neelsen e pelo método de imunofluorescência (IFT) e posterior caracterização genética por PCR-RFLP utilizando o gene 18S rRNA e genes de actina como alvo (Plutzer & Karanis, 2007).

Em 2011, foi ainda realizado um estudo para deteção de *Cryptosporidium* em fezes e conteúdos gástricos de cobras e lagartos, estando incluídas na lista de animais analisados a Cobra do Milho e a Pitão Real, no qual se verificou a presença de *C. varanii* e *Cryptosporidium* genótipo de lagarto na primeira e *C. muris*, *C. baileyi* e *C. parvum* genótipo de rato na segunda (Richter *et al.*, 2011).

Por último, dos animais que se obteve resultados positivos neste trabalho e que anteriormente já tinha sido reconhecidos como hospedeiro do parasita, verificou-se num artigo publicado em 2015 a presença de *Cryptosporidium* no Camaleão do Lémen num estudo que tinha como objetivo a identificação molecular de espécies do parasita em animais domésticos exóticos no Japão, observando-se a presença de *C. varanii* neste animal. Ainda neste estudo se verificou a presença de um genótipo ainda não referenciado anteriormente na Cobra do Milho, sendo o mesmo, *C. serpentis* genótipo de cobra (Abe & Matsubara, 2015).

Outros animais que deram resultados positivos, neste trabalho, mas que não foi encontrada qualquer referência quanto aos mesmos serem hospedeiros de *Cryptosporidium* foram o Lince Euroasiático, Langur de Java, Camelo Selvagem, Elandes, Okapi, Sitatunga, Palanca Ruana, Órix da Arábia, Lémur de Fronte Branca, Lémure Preto e Branco de Colar, Tartaruga espinhosa, Pitão Sanguínea e Anaconda amarela. Apesar de não terem sido encontrados documentos que afirmem os mesmos como hospedeiros, existem documentos que referem a presença em espécies similares de alguns desses animais.

O Lince-pardo (*Lynx rufus*) no caso do Lince Euroasiático, foi designado como hospedeiro de *Cryptosporidium* spp. em 2007, num estudo realizado na população selvagem do Estado de Nova Iorque, EUA, que tinha como objetivo visualizar a prevalência do parasita nesses animais e em que se concluiu que a probabilidade de os animais serem infetados é maior na primavera e que habitem em campos para uso agrícola (Ziegler *et al.*, 2007b).

Quanto aos lémures existem alguns artigos publicados sobre a positividade para presença de *Cryptosporidium* spp. em outras espécies que não as incluídas neste estudo. Num estudo realizado nos EUA em 2008, a lémures cativos e selvagens da espécie *Lemur catta*, designado por Lémur de Cauda Anelada, que tinha como objetivo a pesquisa de bactérias aeróbias, protozoários e helmintes na sua flora intestinal, verificou-se a presença de *Cryptosporidium* nos animais de origem selvagens. Noutro estudo realizado em 2015 a lémures provenientes do Parque Nacional Ranomafana, sem que a espécie dos mesmo seja especificada, verificou-se a presença do parasita neste animal, mais propriamente *C. hominis* (Bodager *et al.*, 2015; Villers *et al.*, 2008).

Sobre a presença de *Cryptosporidium* no Camelo Bactriano selvagens (*Camelus ferus*) não foi encontrada qualquer informação, mas foi encontrada em outras espécies como o Camelo Bactriano (*Camelus bactrianus*) em que se observou a presença de *C. andersoni*, *C. muris*, ou Dromedário (*Camelus dromedarius*), como já referido. A primeira vez que foi reportado a presença do parasita

neste animal foi em 1991, num estudo realizado a uma fêmea de 4 anos que apresentava criptosporidiose crónica, no qual se julga que a infeção tenha sido provocada por *C. muris*, devido às parecenças com esta espécie a nível morfológico. Em 2008, ocorreu pela primeira vez criptosporidiose no Camelo Bactriano, na China, sendo que o isolado demonstrou pertencer à espécie *C. andersoni*, que apresentava semelhanças a todos os outros *C. andersoni*, havendo só algumas diferenças a nível do locus da actina, ou seja, exibia um índice de semelhança de 99,2 % (Cacciò & Widmer, 2014; R Fayer *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2008)

Em outros animais foi ainda observado, durante este estudo, a presença de *Cryptosporidium* em espécies de animais similares tais como a Palanca Negra e Órix de Cimitarra, no caso, da Palanca Ruana e Órix da Arábia respectivamente.

O facto de algumas amostras apresentarem positividade na Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada e não na análise por PCR Quantitativo em Tempo Real poderá dever-se a perda de oocistos durante a extração e purificação das amostras. Para além disso visto as amostras serem fecais, a purificação poderá não ter sido completamente eficiente, fazendo com que houvesse a existência de inibidores moleculares que tornaram o método de PCR também menos eficiente, não permitindo detetar a presença do parasita.

Pelo contrário, quando existe amostra positiva na técnica de PCR mas não na coloração ou seja, a observação dos esfregaços poderá dar um resultado falso negativo, poderá ser devido à concentração do parasita nas amostras ser baixa e só se ter pipetado 10 µL de amostra para as lâminas, fazendo com que a quantidade de amostra utilizada para a coloração possa não ter permitido obter os oocistos presentes na amostra, ou ainda, ter ocorrido um problema durante a coloração que não permitiu corar os mesmos, não sendo por isso observados aquando da visualização ao microscópio.

Verificou-se, através da visualização do mapa do Jardim Zoológico de Lisboa (Figura 3.2), que os animais que apresentaram resultados positivos quanto à presença de *Cryptosporidium*, em ambas as técnicas utilizadas para detetar o parasita, se encontram dispersos por todo o parque, não havendo assim uma fonte de contaminação que possa ser perceptível a partir do local em que os animais infetados se encontram. As amostras correspondentes aos répteis foram somente assinaladas uma vez devido a estarem todos instalados no reptilário, e outros animais, tais como Camelo Bactriano Selvagem, Dromedário, Sitatunga e Pacaça, não foram identificados no mapa devido às instalações destes animais não se encontrarem no mesmo.



Figura 3.2 – Mapa do Jardim Zoológico de Lisboa com a localização dos animais infetados, detectados por ambas as técnicas utilizadas.

3.6. Análise das Amostras de Água por PCR Quantitativo em Tempo Real

A análise feita às amostras de água permitiu verificar que das cinco amostras só uma apresentou a presença do parasita, isto é, só houve resultado positivo para a amostra referente ao Filtro 1 de lavagem do Delfinário (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 - Amostra de água que demonstrou ser positiva para *Cryptosporidium* spp. por PCR Quantitativo em Tempo-Real, apresentando a quantificação da mesma.

	Quantificação (cg/ mL)
Backflow Delfinário Filtro 1	1,39E+02

É de salientar que a amostra em questão pertencia a um filtro que tinha sofrido um choque de cloro três dias antes da sua recolha, permitindo assim verificar a grande resistência que este microrganismo tem a este tipo de desinfecções.

Havendo a presença de *Cryptosporidium* spp. na água, esta poderá ser considerada como uma possível fonte de contaminação para os animais. Inicialmente estava previsto haver a recolha de mais amostragens destes locais, tal como uma maior e mais diversificada recolha de amostragens dos animais, mas por motivos logísticos tal não foi possível.

3.7. Caracterização Genética de *Cryptosporidium*

3.7.1. Detecção e Diferenciação de *Cryptosporidium* através do Gene 18S rRNA

Após a análise das amostras por *Nested*-PCR verificou-se que das 20 amostras, 19 provenientes das fezes dos animais e 1 da água, somente se conseguiu uma amplificação de 4 amostras, sendo as mesmas as amostras 111 (Pitão de Cheyney), 118 (Cobra do Milho), 132 (Cobra Falsa Coral) e 136 (Pitão Real) (Figura 3.3).

A não amplificação de muitas das amostras por *Nested*-PCR poderá dever-se a uma possível degradação natural do DNA, pois mesmo nas condições ótimas pode sempre, com o descongelamento e congelamento das amostras, existir a sua degradação, o que não permitiu realizar a caracterização genética dessas amostras.

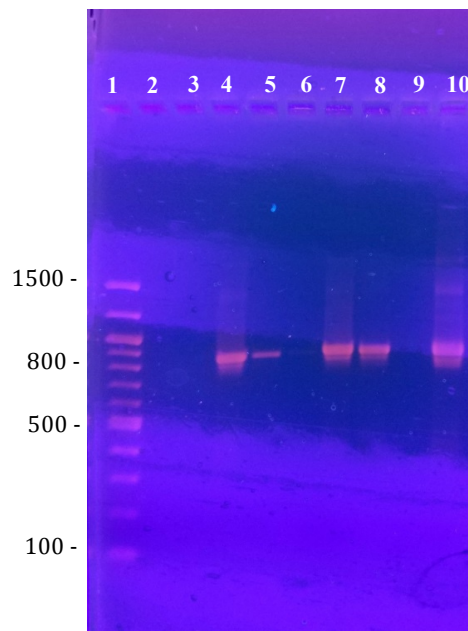


Figura 3.3 – Gel de Electroforese após amplificação das amostras por *Nested*-PCR. 1 – *Ladder* 100 pb; 2 – Amostra 52; 3 – Amostra 110; 4 – Amostra 111; 5 – Amostra 118; 6 – Amostra 123; 7 – Amostra 132; 8 – Amostra 136; 9 – Amostra do Filtro de Lavagem 1 do Delfinário; 10 – Controle positivo *C. parvum*

Após a digestão com as enzimas *Ssp*I e *Vsp*I, verificou-se que as amostras 111 e 118 apresentavam bastante similaridade a nível das bandas apresentadas, tal como ocorreu com as amostras 132 e 136 (Figura 3.4).

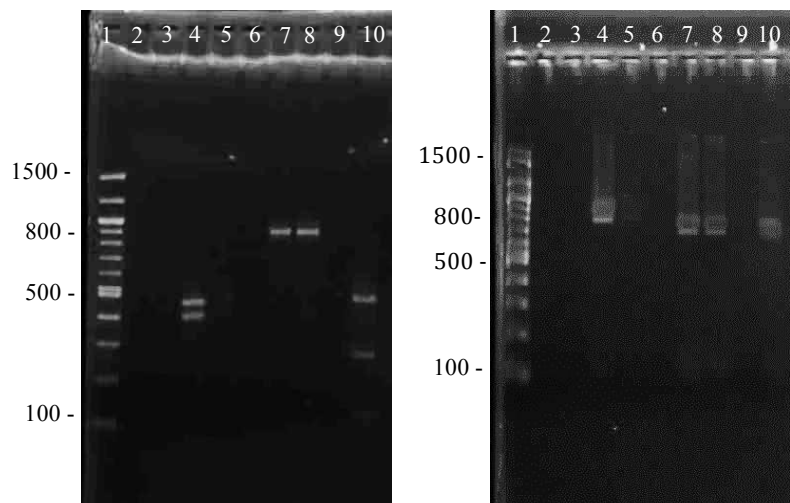


Figura 3.4 – Gel de Electroforese após digestão das amostras com enzimas *Ssp*I (esquerda) e *Vsp*I (direita) após *Nested*-PCR. 1 – *Ladder* 100 pb; 2 – Amostra 52; 3 – Amostra 110; 4 – Amostra 111; 5 – Amostra 118; 6 – Amostra 123; 7 – Amostra 132; 8 – Amostra 136; 9 – Amostra do Filtro de Lavagem 1 do Delfinário; 10 – Controle positivo *C. parvum*

Após análise dos produtos resultantes da digestão realizada com a enzima SspI o tamanho das bandas apresentadas por cada amostra foi 470pb e 416pb na amostra 111, 480pb e 420pb na amostra 118, 968pb na amostra 132 e 989pb na amostra 136. A amostra 118 apresentava pouca concentração do parasita, sendo difícil de visualizar as bandas presentes no gel apresentado.

Na digestão realizada com a enzima VspI, todas as amostras apresentaram somente uma banda. A amostra 111 apresentou uma banda com 782 pb, a amostra 118 com 791 pb, a amostra 132 com 683 pb e por fim a amostra 136 com 667 pb.

Após a comparação das bandas com recurso ao artigo de Xiao *et al.*, 1999, surgiram dúvidas quanto à identificação das amostras 111 e 118, devido à espécie *C. muris* e *C. serpentis* apresentarem bandas similares e não tendo um controlo positivo de ambos no gel não foi possível diferenciar qual das espécies estaria presentes nas amostras, enquanto que não foi possível obter quaisquer resultados quanto à espécie presente nas amostras 132 e 136. As quatro amostras referidas anteriormente foram enviadas para sequenciação. A análise das sequências obtidas, por comparação com bases de dados internacionais, permitiu obter uma identificação de *C. muris* para as amostra 111 e 118 e *Cryptosporidium* sp. para as amostras 132 e 136.

3.7.2. Detecção e Diferenciação de *Cryptosporidium* através do Gene *gp60*

Após a visualização dos resultados obtidos através do método de *Nested*-PCR, verificou-se que nenhuma das amostras correspondia à espécie *C. parvum* ou *C. hominis*. Deste modo, não foi necessário realizar a tipificação de nenhuma das amostras através do gene *gp60*.

4. Conclusão

No decorrer deste estudo conseguiu detetar-se a infeção de várias espécies de animais pertencentes ao Jardim Zoológico de Lisboa por parasitas do género *Cryptosporidium*, sendo que ao todo se encontrou positividade para a sua presença em 40 dos 137 animais analisados, havendo assim uma proporção de prevalência de aproximadamente 29 %. Destes, 32 positivos foram identificados por microscopia por Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada e 19 por PCR Quantitativo em Tempo Real. Ambas as técnicas detetaram baixa quantidade do microrganismo, na maior parte dos animais, o que já seria esperado devido a nenhum dos animais analisados apresentar quaisquer sintomas visíveis da sua infeção.

De todos os animais analisados somente se conseguiu realizar a caracterização genética por PCR-RFLP de quatro das amostras através do gene 18S rRNA, verificando-se a presença de *C. muris* em dois répteis, Pitão de Cheyney e na Cobra do Milho, não tendo sido encontrada qualquer informação sobre estes animais já terem sido hospedeiros desta espécie, e *Cryptosporidium* sp. em outros dois répteis, Cobra Falsa Coral e Pitão Real.

Para além do referido para os animais, também foi verificado a existência de *Cryptosporidium* na água, de um dos filtros de lavagem da piscina do Delfinário analisados, o qual poderá ser considerado como uma das possíveis fontes de contaminação dos animais, não se conseguindo comprovar devido a não ter sido possível realizar a caracterização genética da amostra.

Devido à dispersão dos animais infetados por todo o Jardim Zoológico, não foi assim possível demonstrar qual a potencial fonte de contaminação do parasita, não permitindo assim criar medidas de prevenção que permitam evitar a infeção dos mesmos.

Seria essencial como trabalho futuro realizar mais análises a outras possíveis fontes de contaminação, tais como, as águas que se encontram no interior de cada espaço reservado aos diferentes animais, desde as de beber até às usadas pelos animais para refrescar, analisar a comida dos animais, examinar outros animais que não os do Jardim Zoológico, como pombos, gaivotas ou ratos que poderão ser possíveis transmissores deste parasita e que se podem encontrar espalhados pelo Jardim Zoológico ou mesmo realizar nova análise aos animais, já analisados e outros não observados neste estudo, de maneira a perceber se a criptosporidiose presente nos mesmos poderá ser crónica, podendo assim tentar identificar qual o animal ou animais que poderão estar a infetar os restantes de maneira a tomar medidas de precaução para que a sua transmissão não ocorra.

Para além do supra referido, mais otimizações aos protocolos, desde a sua filtração até à sua análise por coloração ou técnicas moleculares, deverão ser feitas de maneira a se conseguir melhorar as recuperações obtidas, pois é essencial em amostras que apresentem baixa quantidade do microrganismo, para que este seja detetado.

5. Bibliografia

- Abe, N., & Matsubara, K. (2015). Molecular identification of *Cryptosporidium* isolates from exotic pet animals in Japan. *Veterinary Parasitology*, 209(3–4), 254–257.
- Abeywardena, H., Jex, A. R., Nolan, M. J., Haydon, S. R., Stevens, M. A., McAnulty, R. W., & Gasser, R. B. (2012). Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: Discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1984–1993.
- Aldeyarbi, H. M., & Karanis, P. (2015). The Ultra-Structural Similarities between *Cryptosporidium parvum* and the Gregarines. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 79–85.
- Almeida, A. F., Tonani, K. A. A., Segura-Munoz, S. I., Santos, V. M. dos, & Takayanagui, A. M. M. (2009). Adaptação ao Método de Ritchie para diagnóstico de Helmintos e Protozoários em amostras de lodo de esgoto com minimização de produtos químicos TT - La adaptación del Método de Ritchie para la diagnosis de Helmintos y protozoos en muestras de aguas residu. *Mundo Saúde Da Saúde*, 33(4), 427–432.
- Alvarez-Pellitero, P., Quiroga, M. I., Stijà-Bobadilla, A., Redondo, M. J., Palenzuela, O., Padrós, F., Vázquez, S. & Nieto, J. M. (2004). *Cryptosporidium scopthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(1–2), 133–145.
- Alvarez-Pellitero, P., & Stijà-Bobadilla, A. (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1007–1021.
- Alves, M., Xiao, L., Lemos, V., Zhou, L., Cama, V., Da Cunha, M. B., Matos, O. & Antunes, F. (2005). Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. *Parasitology Research*, 97(2), 108–112.
- Amer, S., Honma, H., & Ikarashi, M. (2009). The first detection of *Cryptosporidium* deer-like genotype in cattle in Japan. *Parasitology Research*, 104(4), 745–752.
- Amer, S., Zidan, S., Adamu, H., Ye, J., Roellig, D., Xiao, L., & Feng, Y. (2013). Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Experimental Parasitology*, 135(3), 518–523.
- Anonymous (1982). Cryptosporidiosis: Assessment of Chemotherapy of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 31, pp. 589-592.
- Appelbee, A. J., Thompson, R. C. A., & Olson, M. E. (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - Current status and future needs. *Trends in Parasitology*, 21(8), 370–376.
- Arrowood, M.J. (1997). Diagnosis of *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, (Fayer, R., Ed.). Florida: CRC Press,, 43-64
- Bass, A. L., Wallace, C. C., Yund, P. O., & Ford, T. E. (2012). Detection of *Cryptosporidium* sp. in two new seal species, *Phoca vitulina* and *Cystophora cristata*, and a novel *Cryptosporidium*

- genotype in a third seal species, *Pagophilus groenlandicus*, from the Gulf of Maine. *The Journal of Parasitology*, 98(2), 316–322.
- Bodager, J. R., Parsons, M. B., Wright, P. C., Rasambainarivo, F., Roellig, D., Xiao, L., & Gillespie, T. R. (2015). Complex epidemiology and zoonotic potential for *Cryptosporidium* suis in rural Madagascar. *Veterinary Parasitology*, 207(1–2), 140–143.
- Bouزيد, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M., & Tyler, K. M. (2013). *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 115–134.
- Busch, U. & Nitschko, H. (1999). Methods for the differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 263-278.
- Cacciò, S. M., & Widmer, G. (2014). *Cryptosporidium: Parasite and disease*. (S. M. Cacciò & G. Widmer, Eds.) (1st ed.). Viena: Springer-Verlag Wien.
- Carneiro, M. (2012). *Cryptosporidium e Giardia em águas naturais*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Casemore, D. P. (1990). Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology and Infection*, 104(1), 1–28.
- Casemore, D.P. (1991). ACP Broadsheet 128: June 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 44(6), 445-451.
- Casemore, D. P., Armstrong, M., & Sands, R. L. (1985). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38(12), 1337–1341.
- Cavalier-Smith, T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, 50(5), 472–495.
- Centers for Disease Control and Prevention (a). Cryptosporidiosis: LaboratoryDiagnosis. <<https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/dx.html>>. Acedido em 22/07/2017.
- Centers for Disease Control and Prevention (b). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. <https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/crypto_benchaid.pdf>. Acedido em 21/07/2017.
- Centers for Disease Control and Prevention (c). Parasites - *Cryptosporidium* (also known as "Crypto"). <<https://www.cdc.gov/parasites/crypto/index.html>>. Acedido em 15/07/2017.
- Certad, G., Dupouy-Camet, J., Gantois, N., Hammouma-Ghelboun, O., Pottier, M., Guyot, K., Benamrouz, S., Osman, M., Delaire, B., Creusy, C., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., Aliouat-Denis, C. & Follet, J. (2015). Identification of *Cryptosporidium* species in fish from Lake Geneva (Lac Léman) in France. *PLoS ONE*, 10(7), 1–13.
- Chalmers, R. M., Elwin, K., Hadfield, S. J., & Robinson, G. (2011). Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 536–538.
- Chalmers, R. M., Robinson, G., Elwin, K., Hadfield, S. J., Xiao, L., Ryan, U., Modha, D. &

- Mallaghan, C. (2009). *Cryptosporidium* sp. Rabbit Genotype, a Newly identified Human Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 15(51), 829–830.
- Chauret, C. P., Radziminski, C. Z., Lepuil, M., Creason, R., & Andrews, R. C. (2001). Chlorine Dioxide Inactivation of *Cryptosporidium* Oocysts and Bacterial Spore Indicators. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2993–3001.
- Chavez, D. J., LeVan, I. K., Miller, M. W., & Ballweber, L. R. (2012). Veterinary Parasitology *Baylisascaris procyonis* in raccoons (*Procyon lotor*) from eastern Colorado , an area of undefined prevalence. *Veterinary Parasitology*, 185(2–4), 330–334.
- Church, D., Miller, K., Lichtenfeld, A., Semeniuk, H., Kirkham, B., Laupland, K., & Elsayed, S. (2005). Screening for *Giardia/Cryptosporidium* infections using an enzyme immunoassay in a centralized regional microbiology laboratory. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 129(6), 754–759.
- Cinque, K., Stevens, M. A., Haydon, S. R., Jex, A. R., Gasser, R. B., & Campbell, B. E. (2008). Investigating public health impacts of deer in a protected drinking water supply watershed. *Water Science and Technology*, 58(1), 127–132.
- Clark, J.J. (1985). A study of coccidian met with in mice. *Journal of Cell Science*, 37, 277–283.
- Clode, P. L., Koh, W. H., & Thompson, R. C. A. (2015). Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*, 31(12), 614–624.
- Connelly, L., Craig, B. H., Jones, B., & Alexander, C. L. (2013). Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of soay sheep on St. Kilda Islands, Scotland. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2240–2246.
- Convention on Biological Diversity. What is Taxonomy? <<https://www.cbd.int/gti/taxonomy.shtml>>. Acedido em 08/03/2017.
- Current, W.L. & Reese, N.C. (1986). A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium*. *The Journal of Protozoology*, 33(1), 98–108.
- Current, W. L., Reese, N. C., Ernst, J. V., Bailey, W. S., Heyman, M. B., & Weinstein, W. M. (1983). Human Cryptosporidiosis in Immunocompetent and Immunodeficient persons. *The New England Journal of Medicine*, 308(21), 1252–1257.
- Current, W. L., Upton, S. J., & Haynaw, T. B. (1986). The Life Cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) Infecting Chickens. *Journal of Protozoology*, 33(2), 289–296.
- D’Antonio, R.G., Winn, R.E., Taylor, J.P., Gustafson, T.L., Current, W.L., Rhodes, M.M., Gary, G.W. Jr., Zajac, R.A. (1985). A Waterborne Outbreak of Cryptosporidiosis in Normal Hosts. *Annals of Internal Medicine*, 103(6(Part1)), 886–888.
- De Lucio, A., Merino, F. J., Martínez-Ruiz, R., Bailo, B., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2016). Molecular genotyping and sub-genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 49–56.

- Díaz, P., Rota, S., Marchesi, B., López, C., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morondo, P. & Poglayen, G. (2013). *Cryptosporidium* in pet snakes from Italy: Molecular characterization and zoonotic implications. *Veterinary Parasitology*, 197(1–2), 68–73.
- Djuretic, T., Wall, P.G., Ryan, M.J., Evans, H.S, Adak, G.K., Cowden, J.M. (1996). General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 to 1994. *Communicable disease Report Review*, 6, R57-R63
- Efstratiou, A., Ongerth, J. E., & Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research*, 114, 14–22.
- El-Moamly, A. A. (2014). Immunochromatographic Techniques: Benefits for the Diagnosis of Parasitic Infections. *Austin Chromatography*, 1(4), 1–8.
- Elsafi, S. H., Al-sheban, S. S., Al-jubran, K. M., Abu Hassan, M. M. & Al Zahrani, E. M.. (2014). Comparison of Kinyoun ' s acid-fast and immunofluorescent methods detected an unprecedented occurrence of *Cryptosporidium* in the Eastern Region of Saudi Arabia. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 9(4), 263–267.
- Elwin, K., Hadfield, S. J., Robinson, G., & Chalmers, R. M. (2012). The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiology and Infection*, 140(4), 673–683.
- Evans, H.S., Madden, P., Douglas, C., Adak, G.K., O'Brien, S.J., Djuretic, T., Wall, P.G., Stanwell-Smith, R. (1998). General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Communicable disease Report Review*, 183), 165-171
- Fagiolini, M., Lia, R. P., Laricchiuta, P., Cavicchio, P., Mannella, R., Cafarchia, C., Otranto, D. Finotello, R. & Perrucci, S. (2010). Gastrointestinal parasites in mammals of two Italian zoological gardens. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(4), 662–670.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126(1–2), 37–56.
- Fayer, R., Morgan, U., & Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 1305–1322.
- Fayer, R., Phillips, L., Anderson, B. C., & Bush, M. (1991). Chronic Cryptosporidiosis in a Bactrian Camel (*Camelus-Bactrianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(2), 228–232.
- Fayer, R. Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A., Dubey, J.P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from Domestic Dogs. *Journal of Parasitology*, 87(6), 1415-1422
- Feng, Y., Lal, A. A., Li, N., & Xiao, L. (2011). Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Experimental Parasitology*, 127(1), 238–242.
- Forgacs, P., Tarshis, A., Federman, M., Mele, L., Silverman, M.L., Shea, J.A. (1983). Intestinal and Bronchial Cryptosporidiosis in an Immunodeficient Homosexual Man. *Annals of Internal Medicine*, 99(6), 793-794.
- García-Presedo, I., Pedraza-Díaz, S., González-Warleta, M., Mezo, M., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M., & Castro-Hermida, J. A. (2013). *Veterinary Parasitology* The first report of

- Cryptosporidium bovis*, *C. ryanae* and *Giardia duodenalis* sub-assemblage A-II in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, 197(3–4), 658–664.
- Geurden, T., Goossens, E., Levecke, B., Vercammen, F., Vercruysse, J., & Claerebout, E. (2009). Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in captive wild ruminants in Belgium. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(1), 126–130.
- Gibson-Kueh, S., Yang, R., Thuy, N. T. N., Jones, J. B., Nicholls, P. K., & Ryan, U. (2011). The molecular characterization of an *Eimeria* and *Cryptosporidium* detected in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 91–96.
- Giles, M., Chalmers, R., Pritchard, G., Elwin, K., Mueller-Doblies, D., & Clifton-Hadley, F. (2009). *Cryptosporidium hominis* in a goat and a sheep in the UK. *The Veterinary Record*, 164(1), 24–25.
- Gillespie, T. R., Barelli, C., & Heistermann, M. (2013). Effects of social status and stress on patterns of gastrointestinal parasitism in wild white-handed gibbons (*Hylobates lar*). *American Journal of Physical Anthropology*, 150(4), 602–608.
- Gobet, P., & Toze, S. (2001). Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *FEMS Microbiology Letters*, 200(1), 37–41.
- Goh, S., Reacher, M., Casemore, D. P., Verlander, N. Q., Chalmers, R., Knowles, M., Williams, J., Osborn, K., & Richards, S. (2004). Sporadic Cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996–2000. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6), 1007–1015.
- Goh, S., Reacher, M., Casemore, D. P., Verlander, N. Q., Charlett, A., Chalmers, R. M., Knowles, M., Pennington, A., Williams, J., Osborn, K., & Richards, S. (2005). Sporadic Cryptosporidiosis Decline after Membrane Filtration of Public Water Supplies, England, 1996–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(2), 251–259.
- Gómez, M.S., Torres, J., Gracenea, M., Fernandez-Morán, J., Gonzalez-Moreno, O. (2000). Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona zoo mammals. *Parasitology Research*, 86(4), 318–323.
- Gómez, M. S., Vila, T., Feliu, C., Montoliu, I., Gracenea, M., & Fernandez, J. (1996). A survey for *Cryptosporidium* spp. in mammals at the Barcelona Zoo. *International Journal for Parasitology*, 26(11), 1331–1333.
- Gonzalez-Moreno, O., Hernandez-Aguilar, R. A., Piel, A. K., Stewart, F. A., Gracenea, M., & Moore, J. (2013). Prevalence and climatic associated factors of *Cryptosporidium* sp. infections in savanna chimpanzees from Ugalla, Western Tanzania. *Parasitology Research*, 112(1), 393–399.
- Gracenea, M., Gómez, M. S., Torres, J., Carné, E., & Fernández-Morán, J. (2002). Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona zoo: A long-term study. *Veterinary Parasitology*, 104(1), 19–26.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., Mann, J., & Strandberg, J. D. (1998). Intestinal *Cryptosporidium* sp. infection in the Egyptian tortoise, *Testudo kleinmanni*. *International Journal for Parasitology*, 28(12), 1885–1888.

- Gu, Y., Wang, X., Zhou, C., Li, P., Xu, Q., Zhao, C., Liu, W. & Xu, W. (2016). Investigation on *Cryptosporidium* Infections in Wild Animals in a Zoo in Anhui Province. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(3), 846–854.
- Guy, R. A., Payment, P., Krull, U. J., Paul, A., & Horgen, P. A. (2003). Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5178–5185.
- Guzman-Herrador, B., Carlander, A., Ethelberg, S., De Blasio, B. F., Kuusi, M., Lund, V., Löfdahl, M., MacDonald, E., Nichols, G., Schönning, C., Sudre, B., Trönnberg, L., Vold, L., Semenza, J.C. & Nygard, K. (2015). Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. *Eurosurveillance*, 20(24), 1–10.
- Hadfield, S. J., Robinson, G., Elwin, K., & Chalmers, R. M. (2011). Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of Real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 918–924.
- Hahn, N. E., & Capuano III, S. V. (2010). Successful Treatment of Cryptosporidiosis in 2 Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) by Using Paromomycin. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49(6), 873–875.
- Hajdušek, O., Ditrich, O., & Šlapeta, J. (2004). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122(3), 183–192.
- Heuschele, W.P., Oosterhuis, J., Janssen, D., Robinson, P.T., Ensley, P.K., Meier, J.E., Olson, T., Anderson, M.P., Benirschke, K. (1986). Cryptosporidial infections in captive wild animals. *Wildlife Disease Association*, 22(4), 493-496.
- Hijjawi, N. S., Meloni, B. P., Ng'anzo, M., Ryan, U. M., Olson, M. E., Cox, P. T., Monis, P. T. & Thompson, R. C. A. (2004). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, 34(7), 769–777.
- Hill, V. R., Kahler, A. M., Jothikumar, N., Johnson, T. B., Hahn, D., & Cromeans, T. L. (2007). Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4218–4225.
- Hlavsa, M. C., Roberts, V. A., Anderson, A. R., Hill, V. R., Kahler, A. M., Orr, M., Garrison, L. E., Hicks, L. A., Newton, A., Hilborn, E. D., Wade, T. J., Beach, M. J. & Yoder, J. S. (2011). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks and other Health Events associated with Recreational Water - United States, 2007-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60(12), 1–37.
- Hogan, J. N., Miller, W. A., Cranfield, M. R., Ramer, J., Hassell, J., Noheri, J. B., Conrad, P. A., & Gilardi, K. V. K. (2014). *Giardia* in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), forest buffalo (*Syncerus caffer*), and domestic cattle in Volcanoes National Park, Rwanda. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(1), 21–30.
- Hunter, P. R., Hadfield, S. J., Wilkinson, D., Lake, I. R., Harrison, F. C. D., & Chalmers, R. M. (2007). Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 82–88.

- Hunter, P. R., Hughes, S., Woodhouse, S., Syed, Q., Verlander, N. Q., Chalmers, R. M., Morgan, K., Nichols, G., Beeching, N. & Osborn, K. (2004). Sporadic Cryptosporidiosis Case- Control Study with Genotyping. *Emerging Infectious Diseases*, 10(7), 1241–1249.
- Jenkins, M., O'Brien, C., Fetterer, R. & Santín, M. (2015). RT-PCR specific for *Cryptosporidium* is a highly sensitive method for detecting *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Food and Waterborne Parasitology*, 5, 14-20.
- Ježková, J., Horčíčková, M., Hlásková, L., Sak, B., Květoňová, D., Novák, J., Hofmannová, L., McEvoy, J. & Kváč, M. (2016). *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium* tortoise genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica*, 63, 1–10.
- Jiang, J., & Xiao, L. (2003). An Evaluation of Molecular Diagnostic Tools for the Detection and Differentiation of Human-Pathogenic *Cryptosporidium* spp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, 542–547.
- Jirku, M., Valigurová, A., Koudela, B., Jaroslav, K., Modrý, D., & Šlapeta, J. (2008). New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, 55(2), 81–94.
- Jokipii, L., Pohjola, S., & Jokipii, A. M. M. (1983). Cryptosporidium: A Frequent Finding In Patients With Gastrointestinal Symptoms. *The Lancet*, 2(8346), 358–361.
- Karanis, P., Plutzer, J., Halim, N. A., Igori, K., Nagasawa, H., Ongerth, J., & Liqing, M. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitology Research*, 101(6), 1575–1580.
- Karim, M. R., Zhang, S., Jian, F., Li, J., Zhou, C., Zhang, L., Sun, M., Yang, G., Zou, F., Dong, H., Li, J., Rume, F. I., Qi, M., Wang, R., Ning, C. & Xiao, L. (2014). Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from non-human primates in China. *International Journal for Parasitology*, 44(13), 1039–1047.
- Katsumata, T., Hosea, D., Ranuh, I. G., Uga, S., Yanagi, T., & Kohno, S. (2000). Short report: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(1), 70–72.
- Khalakdina, A., Vugia, D. J., Nadle, J., Rothrock, G. A., & Jr, J. M. C. (2003). Is drinking water a risk factor for endemic cryptosporidiosis? A case-control study in the immunocompetent general population of the San Francisco Bay Area. *BMC Public Health*, 3, 1–10.
- Kimbell III, L. M., Miller, D. L., Chavez, W., & Altman, N. (1999). Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism-based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5345–5349.
- Kodádková, A., Kváč, M., Ditrich, O., Sak, B., & Xiao, L. (2010). *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *Journal of Parasitology*, 96(1), 211–212.
- Koehler, A. V., Whipp, M. J., Haydon, S. R., & Gasser, R. B. (2014). *Cryptosporidium cuniculus*--new

- records in human and kangaroo in Australia. *Parasites & Vectors*, 7(1), 492.
- Koh, W., Clode, P. L., Monis, P., & Thompson, R. C. A. (2013). Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasites & Vectors*, 6(1), 270.
- Koh, W., Thompson, A., Edwards, H., Monis, P., & Clode, P. L. (2014). Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BMC Microbiology*, 14, 281.
- Koinari, M., Karl, S., Ng-Hublin, J., Lymbery, A. J., & Ryan, U. M. (2013). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology*, 198(1–2), 1–9.
- Koinari, M., Lymbery, A. J., & Ryan, U. M. (2014). *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. *Experimental Parasitology*, 141(1), 134–137.
- Kváč, M., Havrdová, N., Hlásková, L., Daňková, T., Kanděra, J., Ježková, J., Vítovec, J., Sak, B., Ortega, Y., Xiao, L., Modry, D., Chelladurai, J. R. J. J., Prantlová, V. & McEvoy, J. (2016). *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS ONE*, 11(1), 1–24.
- Laboratório de análises do Instituto Superior Técnico. Microbiologia Novas Técnicas: *Cryptosporidium* e *Giardia*. <http://la.tecnico.ulisboa.pt/Cryptosporidium_Giardia.html>. Acedido em 15/07/2017.
- Laboratory Centre for Disease Control (1991). The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 2(2), 89-91
- Langhout, M. V. Z., Reed, P., & Fox, M. (2010). Validation of Multiple Diagnostic Techniques to Detect *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in Free-Ranging Western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and Observations on the Prevalence of these Protozoan Infections in Two Populations in Gabon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(2), 210–217.
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Díaz, S., & McLauchlin, J. (2006). Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, 55(6), 703–707.
- Lesnianska, K., Perec-matysiak, A., Hildebrand, J., Bunkowska-Gawlik, K., Piróg, A., & Popiolek, M. (2016). *Cryptosporidium* spp . and *Enterocytozoon bienersi* in introduced raccoons (*Procyon lotor*) — first evidence from Poland and Germany. *Parasitology Research*, 115(12), 4535–4541.
- Lucio-Forster, A., Griffiths, J. K., Cama, V. A., Xiao, L., & Bowman, D. D. (2010). Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*, 26(4), 174–179.
- Ma, P., & Soave, R. (1983). Three-Step Stool Examination for Cryptosporidiosis in 10 Homosexual Men with Protracted Watery Diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases*, 147(5), 824–828.
- Mackenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B. & Davis, J. P. (1994). A Massive

- Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, 331(3), 161–167.
- Mahapatra, D., Reinhard, M., & Naikare, H. K. (2013). Adenovirus and *Cryptosporidium* co-infection in a corn snake (*Elaphe guttata guttata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(1), 220–224.
- Martin, H. D., & Zeidner, N. S. (1992). Concomitant Cryptosporidia, Coronavirus and Parvovirus Infection in a Raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Wildlife Diseases*, 28(1), 113–115.
- Martínez-Ruiz, R., de Lucio, A., Fuentes, I., & Carmena, D. (2015). Autochthonous *Cryptosporidium cuniculus* infection in Spain: First report in a symptomatic paediatric patient from Madrid. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 34(8), 532–534.
- Mayoclinic. *Cryptosporidium* infection: Symptoms and causes. <<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cryptosporidium/symptoms-causes/dxc-20272947>>. Acedido em 14/07/2017.
- Mbaya, A. W., & Udendeye, U. J. (2011). Gastrointestinal parasites of captive and free-roaming primates Nigeria. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.
- Meinhardt, P.L., Casemore, D.P. & Miller, K.B. (1996). Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiologic Reviews*, 18(2), 118–136.
- Meisel, L., Perera, D. R., Meligro, C., & Rubin, C. E. (1976). Overwhelming Watery Diarrhea Associated With a *Cryptosporidium* in an Immunosuppressed Patient. *Gastroenterology*, 70(6), 1156–1160.
- Miller, R.A., Bronsdon, M.A., Kuller, L., Morton, W.R. (1990). Clinical and parasitologic aspects of cryptosporidiosis in nonhuman primates. *Laboratory Animal Science*, 40(1), 42–46.
- Mølbak, K., Andersen, M., Aaby, P., Højlyng, N., Jakobsen, M., Sodemann, M., & Da Silva, A. P. J. (1997). *Cryptosporidium* infection in infancy as a cause of malnutrition: A community study from Guinea-Bissau, West Africa. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(1), 149–152.
- Morgan, U., Deplazes, P., Forbes, D.A., Spano, F., Hertzberg, H., Sargent, K.D., Elliot, A., Thompson, R.C. (1999). Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitology*, 118(Pt1), 49–58.
- Morgan, U., Weber, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Thompson, R. C. A., Ndiritu, W., Lal, A., Moore, A. & Deplazes, P. (2000). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates Obtained from Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1180–1183.
- Mtambo, M. M. A., Sebatwale, J. B., Kambarage, D. M., Muhairwa, A. P., Maeda, G. E., Kusiluka, L. J., & Kazwala, R. R. (1997). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine*, 31(3–4), 185–190.
- Murphy, J. L., Haas, C. N., Arrowood, M. J., Hlavsa, M. C., Beach, M. J., & Hill, V. R. (2014). Efficacy of chlorine dioxide tablets on inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. *Environmental Science and Technology*, 48(10), 5849–5856.

- Mynářová, A., Foitová, I., Kváč, M., Květoňová, D., Rost, M., Morrogh-Bernard, H., Nurcahyo, W., Nguyen, C., Supriyadi, S. & Sak, B. (2016). Prevalence of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon* spp. and *Giardia intestinalis* in wild, semi-wild and captive orangutans (*Pongo abelii* and *Pongo pygmaeus*) on Sumatra and Borneo, Indonesia. *PLoS ONE*, 11(3), 1–15.
- National Center for Biotechnology Information. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>>. Acedido em 25/07/2017.
- Němejc, K., Sak, B., Květoňová, D., Kernorová, N., Rost, M., Cama, V. A., & Kváč, M. (2013). Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial suine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices, 112(3), 1143–1154.
- Ng, J., Yang, R., Whiffin, V., Cox, P., & Ryan, U. (2011). Identification of Zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes infecting animals in Sydney's water catchments. *Experimental Parasitology*, 128(2), 138–144.
- Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., & Yardley, J. H. (1976). Acute Enterocolitis In A Human Being Infected With The Protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70(4), 592–598.
- Nolan, M. J., Jex, A. R., Koehler, A. V., Haydon, S. R., Stevens, M. A., & Gasser, R. B. (2013). Molecular-based investigation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from animals in water catchments in southeastern Australia. *Water Research*, 47(5), 1726–1740.
- O'Donoghue, P. J. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis of man and animals in India. *International Journal for Parasitology*, 25(2), 139–195.
- O'Hara, S. P., & Chen, X. M. (2011). The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection*, 13(8–9), 721–730.
- Orós, J., Rodríguez, J. L., Patterson-kane, J., Rodriguez, L., & Patterson-kane, J. (1998). Gastric Cryptosporidiosis in a Wild Frilled Lizard From Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(4), 807–810.
- Paiva-Cavalcanti, M., Regis-da-Silva, C., & Gomes, Y. (2010). Comparison of Real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16(4), 537–542.
- Palmer, S. R., & Biffin, A. (1990). Cryptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features. *British Medical Journal*, 300(6727), 774–777.
- Panciera, R. J., Thomassen, R. W., & Garner, F. M. (1971). Cryptosporidial Infection in a Calf. *Veterinary Pathology*, 8, 479–484.
- Parsons, M. B., Travis, D., Lonsdorf, E. V., Lipende, I., Roellig, D. M. A., Kamenya, S., Zhang, H., Xiao, L. & Gillespie, T. R. (2015). Epidemiology and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Humans, Wild Primates, and Domesticated Animals in the Greater Gombe Ecosystem, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–13.
- Pavlassek, I., & Ryan, U. (2008). *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*.

Experimental Parasitology, 118(3), 434–437.

- Pedraza-díaz, S., Amar, C., Nichols, G. L., & Mclauchlin, J. (2001). Nested Polymerase Chain Reaction for Amplification of the *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein Gene. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 49–56.
- Perz, J. F., & Le Blancq, S. M. (2001). *Cryptosporidium parvum* Infection Involving Novel Genotypes in Wildlife from Lower New York State. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1154–1162.
- Plutzer, J., & Karanis, P. (2007). Molecular identification of a *Cryptosporidium saurophilum* from corn snake (*Elaphe guttata guttata*). *Parasitology Research*, 101(4), 1141–1145.
- Power, M. L. (2010). Biology of *Cryptosporidium* from marsupial hosts. *Experimental Parasitology*, 124(1), 40–44.
- Power, M. L., & Ryan, U. M. (2008). A New Species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) from Eastern Grey Kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, 94(5), 1114–1117.
- Puleston, R. L., Mallaghan, C. M., Modha, D. E., Hunter, P. R., Nguyen-Van-Tam, J. S., Regan, C. M., Nichols, G. L. & Chalmers, R. M. (2014). The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. *Journal of Water and Health*, 12(1), 41–50.
- Quintero-Betancourt, W., Peele, E. R., & Rose, J. B. (2002). *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *Journal of Microbiological Methods*, 49(3), 209–224.
- Quiroz, E. S., Bern, C., MacArthur, J. R., Xiao, L., Fletcher, M., Arrowood, M. J., Shay, D. K., Levy, M. E. Glass, R. I. & Lal, A. (2000). An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 695–700.
- Ramirez, N. E., Ward, L. A., & Sreevatsan, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6(8), 773–785.
- Ravaszova, P., Halanova, M., Goldova, M., Valencakova, A., Malcekova, B., Hurniková, Z., & Halan, M. (2012). Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitology Research*, 110(1), 469–471.
- Razavi, S. M., Oryan, A., Bahrami, S., Mohammadalipour, A., & Gowhari, M. (2009). Prevalence of *Cryptosporidium* infection in camels (*Camelus dromedarius*) in a slaughterhouse in Iran. *Tropical Biomedicine*, 26(3), 267–273.
- Reboredo-Fernández, A., Gómez-Couso, H., Martínez-Cedeira, J. A., Cacciò, S. M., & Ares-Mazás, E. (2014). Detection and molecular characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in common dolphins (*Delphinus delphis*) stranded along the Galician coast (Northwest Spain). *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 132–137.
- Reid, A., Lymbery, A., Ng, J., Tweedle, S., & Ryan, U. (2010). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Veterinary Parasitology*, 168(1–2), 190–195.

- Rengifo-Herrera, C., Ortega-Mora, L. M., Gómez-Bautista, M., García-Moreno, F. T., García-Parraga, D., Castro-Urda, J., & Pedraza-Díaz, S. (2011). Detection and Characterization of a *Cryptosporidium* Isolate from a Southern Elephant Seal (*Mirounga leonina*) from the Antarctic Peninsula. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1524–1527.
- Rengifo-Herrera, C., Ortega-Mora, L. M., Gómez-Bautista, M., García-Párraga, D., Pedraza-Díaz, S., & García-Párraga, F. J. (2013). Detection of a novel genotype of *Cryptosporidium* in Antarctic pinnipeds. *Veterinary Parasitology*, 191(1–2), 112–118.
- Richter, B., Nedorost, N., Maderner, A., & Weissenböck, H. (2011). Detection of *Cryptosporidium* species in feces or gastric contents from snakes and lizards as determined by polymerase chain reaction analysis and partial sequencing of the 18S ribosomal RNA gene. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(3), 430–435.
- Ritchie, L.S. (1948). An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the U.S. Army Medical Department*, 8(4), 326.
- Robertson, B., Sinclair, M. I., Forbes, A. B., Veitch, M., Kirk, M., Cunliffe, D., Willis, J. & Fairley, C. K. (2002). Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide , Australia. *Epidemiology and Infection*, 128(3), 419–431.
- Robinson, G. (2005). Investigating the Public Health Significance of *Cryptosporidium* in the Environment. University of Wales College of Medicine.
- Rosales, M. J., Cordon, G. P., Moreno, M. S., Sánchez, C. M., & Mascaró, C. (2005). Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica*, 95(1), 74–78.
- Rose, J.B., Lisle, J.T. and Lechevallier, M. (1997). Waterborne Cryptosporidiosis: Incidence, Outbreaks, and Treatment Strategies. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, (Fayer, R., Ed.). Florida: CRC Press, 93-109.
- Rose, J. B., Huffman, D. E., & Gennaccaro, A. (2002). Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiology*, 26(2), 113–123.
- Roy, S. L., DeLong, S. M., Stenzel, S. A., Shiferaw, B., Roberts, J. M., Khalakdina, A., Marcus, R., Segler, S. D., Shah, D. D., Thomas, S., Vugia, D. J., Zansky, S. M., Dietz, V., Beach, M. J. & Beach, M. J. (2004). Risk factors for Sporadic Cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 2944–2951.
- Royer, M., Xiao, L. & Lal, A. (2002). Animal Source Identification Using a *Cryptosporidium* DNA Characterization Technique. EPA/600/R-03/047.
- Ryan, U. (2010). *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*, 124(1), 113–120.
- Ryan, U., Fayer, R., & Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 141(13), 1667–1685.
- Ryan, U. M., Power, M., & Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic*

Microbiology, 55(1), 22–26.

- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., & Hijjawi, N. (2016a). It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*, 105, 305–313.
- Ryan, U., & Power, M. (2012). *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology*, 139(13), 1673–88.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A. a, & Pavlasek, I. (2003). Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4302–4307.
- Ryan, U., Zahedi, A., & Paparini, A. (2016b). *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology*, 38(9), 535–547.
- Sak, B., Petzelkova, K. J., Kvetonova, D., Mynarova, A., Shutt, K. A., Pomajbikova, K., Kalousova, B., Modry, D., Benavides, J., Todd, A. & Kvac, M. (2013). Long-Term Monitoring of Microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at Different Stages of Habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS ONE*, 8(8), 1–10.
- Salyer, S. J., Gillespie, T. R., Rwego, I. B., Chapman, C. A., & Goldberg, T. L. (2012). Epidemiology and molecular relationships of *Cryptosporidium* spp. in people, primates, and livestock from Western Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4), 1–6.
- Samra, N. A., Jori, F., Samie, A., & Thompson, P. (2011). The prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in wild mammals in the Kruger National Park, South Africa. *Veterinary Parasitology*, 175(1–2), 155–159.
- Samra, N. A., Jori, F., Xiao, L., Rikhotso, O., & Thompson, P. N. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* species at the wildlife/livestock interface of the Kruger National Park, South Africa. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(3), 295–302.
- Santín, M. (2013). Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(1), 1–10.
- Santin, M., Dixon, B. R., & Fayer, R. (2005). Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in northern Quebec, Canada. *Journal of Parasitology*, 91(3), 712–716.
- Sazmand, A., & Joachim, A. (2017). Parasitic diseases of camels in Iran (1931-2017) - A literature review. *Parasite*, 24, 1–15.
- Sheater, A.L. (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *Journal Of Comparative Pathology And Therapeutics*, 36, 266-275
- Shrivastava, A.K., Kumar, S., Smith, W.A., Sahu, P.S. (2017). Revisiting the global problem of cryptosporidiosis and recommendations. *Tropical Parasitology*, 7(1), 8-17.
- Slavin, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, 65(3), 262–266.

- Smith, H. V, Nichols, R. A. B., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W. J., Browning, L. M., Gray, D., Reid, S. W. J. & Wastling, J. M. (2005). Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *The Veterinary Record*, 156(22), 710–711.
- Sturbaum, G. D., Jost, B. H., & Sterling, C. R. (2003). Nucleotide changes within three *Cryptosporidium parvum* surface protein encoding genes differentiate genotype I from genotype II isolates. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 128(1), 87–90.
- Sturdee, A. P., Chalmers, R. M., & Bull, S. A. (1999). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*, 80(4), 273–280.
- Sulaiman, I. M., Hira, P. R., Zhou, L., Al-Ali, F. M., Al-Shelahi, F. A., Shweiki, H. M., Iqbal, J., Khalid, N. & Xiao, L. (2005). Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2805–2809.
- Sulaiman, I. M., Xiao, L., & Lal, A. A. (1999). Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4431–4435.
- Tahvildar-Biderouni, F., & Salehi, N. (2014). Detection of *Cryptosporidium* infection by modified ziehl-neelsen and PCR methods in children with diarrheal samples in pediatric hospitals in Tehran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 7(2), 125–130.
- Teixeira, C. S., Almeida, A. J. & Oliveira, F. C. R. (2008). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. Isolados de Bezerros Bovinos: Pleomorfismo em relação à metodologia de diagnóstico. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(1), 230-233.
- Tenter, A. M., Barta, J. R., Beveridge, I., Duszynski, D. W., Mehlhorn, H., Morrison, D. A., Thompson, R. C. A. & Conrad, P. A. (2002). The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 595–616.
- Thompson, R. C. A., Koh, W. H., & Clode, P. L. (2016). *Cryptosporidium* — What is it? *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 54–61.
- Thompson, R. C. A. Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijjawi, N.S. (2005.) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59, 77-158.
- Traversa, D. (2010). Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasites & Vectors*, 3, 1–4.
- Tyzzer, E. E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 5(1), 12–13.
- Tyzzer, E. E. (1910). An extracellular coccidium. *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*, 23, 487-511.
- Tzipori, S., Smith, M., Birch, C., Bames, G., Bishop, R. (1983). Cryptosporidiosis in Hospital Patients with Gastroenteritis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(5), pp. 931-934.
- United States Environmental Protection Agency (2005). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA 815-R-05-002. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

- Valigurová, A., Hofmannová, L., Koudela, B., & Vávra, J. (2007). An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(6), 495–510.
- Van Winkle, Y. J. (1985). Cryptosporidiosis in young artiodactyls. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(11), 1170-1172.
- Vetterling, J. M., Jervis, H. R., Merrill, T. G., & Sprinz, H. (1971). *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea Pig *Cavia porcellus*, with an Emendation of the Genus. *Journal of Protozoology*, 18(2), 243–247.
- Villers, L.M., Jang, S.S., Lent, C.L., Lewin-Koh, S.C. & Norosoarainivo, J.A. (2008). Survey and comparison of major intestinal flora in captive and wild ring-tailed lemur (*Lemur catta*) populations. *American Journal of Primatology*, 70(2), 175-184.
- Wang, R., Zhang, L., Ning, C., Feng, Y., Jian, F., Xiao, L., Lu, B., Ai, W. & Dong, H. (2008). Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitology Research*, 102(5), 915–920.
- Widerström, M., Schönning, C., Lilja, M., Lebbad, M., Ljung, T., Allestam, G., ... Lindh, J. (2014). Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, 20(4), 581–589.
- Wiedenmann, A., Kruger, P., & Botzenhart, K. (1998). PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples — a review of published protocols and current developments. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21(3), 150–166.
- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*, 124(1), 80–89.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H. & Lal, A. A. (2001). Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(3), 492–497.
- Xiao, L., Cama, V. A., Cabrera, L., Ortega, Y., Pearson, J., & Gilman, R. H. (2007). Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 2014–2016.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. M., & Upton, S. J. (2004a). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72–97.
- Xiao, L. & Ryan, U. M. (2004). Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current opinions in infectious diseases*, 17(5), 483-490.
- Xiao, L., Ryan, U. M., Graczyk, T. K., Limor, J., Li, L., Kombert, M., Junge, R., Sulaiman, I. M., Zhou, L., Arrowood, M. J., Koudela, B., Modry, D. & Lal, A. A. (2004b). Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. in Captive Reptiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 891–899.
- Xiao, L., Sulaiman, I. M., Ryan, U. M., Zhou, L., Atwill, E. R., Tischler, M. L., Zhang, X., Fayer, R. & Lal, A. A. (2002). Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*:

- Implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, 32(14), 1773–1785.
- Ye, J., Xiao, L., Ma, J., Guo, M., Liu, L., & Feng, Y. (2012). Anthroponotic enteric parasites in monkeys in public park, China. *Emerging Infectious Diseases*, 18(10), 1640–1643.
- Yimming, B., Pattanatanang, K., Sanyathitiseree, P., Inpankaew, T., Kamyinkird, K., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., & Phasuk, J. (2016). Molecular identification of cryptosporidium species from pet snakes in Thailand. *Korean Journal of Parasitology*, 54(4), 423–429.
- Young, K. H., Bullock, S. L., Melvin, D. M., & Spruill, C. L. (1979). Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(6), 852–853.
- Yui, T., Nakajima, T., Yamamoto, N., Kon, M., Abe, N., Matsubayashi, M., & Shibahara, T. (2014). Age-related detection and molecular characterization of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* in pre- and post-weaned piglets and adult pigs in Japan. *Parasitology Research*, 113(1), 359–365.
- Zahedi, A., Paparini, A., Jian, F., Robertson, I., & Ryan, U. (2015). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 88–109.
- Zarlenga, D. S., & Trout, J. M. (2004). Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Veterinary Parasitology*, 126(1–2), 195–217.
- Zhang, W., Yang, F., Liu, A., Wang, R., Zhang, L., Shen, Y., Cao, J. & Ling, H. (2013). Prevalence and Genetic Characterizations of *Cryptosporidium* spp . in Pre-Weaned and Post-Weaned Piglets in Heilongjiang Province , China. *PLoS ONE*, 8(7), 1–6.
- Zhou, L., Fayer, R., Trout, J. M., Ryan, U. M., Schaefer III, F. W., & Xiao, L. (2004). Genotypes of *Cryptosporidium* Species Infecting Fur-Bearing Mammals Differ from Those of Species Infecting Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7574–7577.
- Ziegler, P. E., Wade, S. E., Schaaf, S. L., Chang, Y., & Mohammed, H. O. (2007a). *Cryptosporidium* spp . From Small Mammals In The New York City Watershed. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4), 586–596.
- Ziegler, P. E., Wade, S. E., Schaaf, S. L., Stern, D. A., Ndareski, C. A., & Mohammed, H. O. (2007b). Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 147(1–2), 176–184.

6. Anexos

Anexo I – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
1	Ocelote	<i>Leopardus pardalis</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
2	Lince Euroasiático	<i>Lynx lynx</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Positivo	Negativo	Não	-	-
3	Órix de Cimitarra	<i>Oryx dammah</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Van Winkle, 1985)
4	Hipopótamo	<i>Hippopotamus amphibius</i>	Hippopotamidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
5	Lince Ibérico	<i>Lynx pardinus</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
6	Jaguar	<i>Panthera onca onca</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
7	Leopardo Pérsia	<i>Panthera pardus saxicolor</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Positivo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato	(Karanis <i>et al.</i> , 2007)
8	Leopardo Pérsia	<i>Panthera pardus saxicolor</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato	(Karanis <i>et al.</i> , 2007)
9	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Hominidae	Primates	Individual	Positivo	Negativo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gonzalez-Moreno <i>et al.</i> , 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Parsons <i>et al.</i> , 2015)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
10	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Hominidae	Primates	Individual	Positivo	Positivo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gonzalez-Moreno <i>et al.</i> , 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Parsons <i>et al.</i> , 2015)
11	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Hominidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gonzalez-Moreno <i>et al.</i> , 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Parsons <i>et al.</i> , 2015)
12	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Hominidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gonzalez-Moreno <i>et al.</i> , 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Parsons <i>et al.</i> , 2015)
13	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Hominidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gonzalez-Moreno <i>et al.</i> , 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Parsons <i>et al.</i> , 2015)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
14	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Hominidae	Primates	Individual	Positivo	Negativo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gonzalez-Moreno <i>et al.</i> , 2013; Mbaya & Udendeye, 2011; Parsons <i>et al.</i> , 2015)
15	Gorila Ocidental das Terras Baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Hominidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gómez <i>et al.</i> , 2000; Sak <i>et al.</i> , 2013; Langhout <i>et al.</i> , 2010)
16	Gorila Ocidental das Terras Baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Hominidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. bovis</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. suis</i>	(Gómez <i>et al.</i> , 2000; Sak <i>et al.</i> , 2013; Langhout <i>et al.</i> , 2010)
17	Colobo Guereza Kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Salyer <i>et al.</i> , 2012)
18	Orangotango de Sumatra	<i>Pongo abelii</i>	Hominidae	Primates	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> e <i>C. muris</i>	(Mynářová <i>et al.</i> , 2016)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
19	Orangotango de Sumatra	<i>Pongo abelii</i>	Hominidae	Primates	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> e <i>C. muris</i>	(Mynářová <i>et al.</i> , 2016)
20	Langur de Java	<i>Trachypithecus auratus</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Positivo	Positivo	Não	-	-
21	Búfalo Africano	<i>Syncerus caffer caffer</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Sim	<i>C. ubiquitum</i> , <i>C. bovis</i> e <i>C. proliferans</i>	(Gómez <i>et al.</i> , 1996; Kváč <i>et al.</i> , 2016; Mtambo <i>et al.</i> , 1997; Samra <i>et al.</i> , 2011, 2013)
22	Búfalo Africano	<i>Syncerus caffer caffer</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. ubiquitum</i> , <i>C. bovis</i> e <i>C. proliferans</i>	(Gómez <i>et al.</i> , 1996; Kváč <i>et al.</i> , 2016; Mtambo <i>et al.</i> , 1997; Samra <i>et al.</i> , 2011, 2013)
23	Búfalo Africano	<i>Syncerus caffer caffer</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. ubiquitum</i> , <i>C. bovis</i> e <i>C. proliferans</i>	(Gómez <i>et al.</i> , 1996; Kváč <i>et al.</i> , 2016; Mtambo <i>et al.</i> , 1997; Samra <i>et al.</i> , 2011, 2013)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
24	Bisonte Americano	<i>Bison bison bison</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp. genótipo de rato	(Alves <i>et al.</i> , 2005)
25	Bisonte Americano	<i>Bison bison bison</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp. genótipo de rato	(Alves <i>et al.</i> , 2005)
26	Girafa de Angola	<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>	Giraffidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Gómez <i>et al.</i> , 1996)
27	Girafa de Angola	<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>	Giraffidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Gómez <i>et al.</i> , 1996)
28	Girafa de Angola	<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>	Giraffidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Gómez <i>et al.</i> , 1996)
29	Camelo Selvagem	<i>Camelus ferus</i>	Camelidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Positivo	Não	-	-
30	Impala de Face Negra	<i>Aepyceros melampus petersi</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Positivo	Sim	<i>C. ubiquitum</i>	(Samra <i>et al.</i> , 2011, 2013)
31	Órix de Cimitarra	<i>Oryx dammah</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Positivo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Van Winkle, 1985)
32	Órix Austral	<i>Oryx gazella</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
33	Órix Austral	<i>Oryx gazella</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
34	Elande	<i>Tragelaphus oryx</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Não	-	-

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
35	Elande	<i>Tragelaphus oryx</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Não	-	-
36	Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>	Giraffidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
37	Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>	Giraffidae	Artiodactyla	Individual	Positivo	Negativo	Não	-	-
38	Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>	Giraffidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
39	Palanca Negra	<i>Hippotragus niger niger</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo bovino	(Hajdušek <i>et al.</i> , 2004)
40	Palanca Negra	<i>Hippotragus niger niger</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo bovino	(Hajdušek <i>et al.</i> , 2004)
41	Palanca Negra	<i>Hippotragus niger niger</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo bovino	(Hajdušek <i>et al.</i> , 2004)
42	Palanca Ruana	<i>Hippotragus equinus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Não	-	-
43	Palanca Ruana	<i>Hippotragus equinus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Não	-	-
44	Palanca Ruana	<i>Hippotragus equinus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Não	-	-
45	Urso Formigueiro Gigante	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Myrmecophagidae	Xenarthra	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
46	Leopardo Pérsia	<i>Panthera pardus saxicolor</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato	(Karanis <i>et al.</i> , 2007)
47	Leopardo Pérsia	<i>Panthera pardus saxicolor</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato	(Karanis <i>et al.</i> , 2007)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
48	Camelo Selvagem	<i>Camelus ferus</i>	Camelidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Não	-	-
49	Dromedário	<i>Camelus dromedarius</i>	Camelidae	Artiodactyla	Individual	Positivo	Negativo	Sim	<i>C. andersoni</i>	(Gu <i>et al.</i> , 2016; Razavi <i>et al.</i> , 2009; Sazmand & Joachim, 2017)
50	Sitatunga	<i>Tragelaphus spekii</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Não	-	-
51	Pacaça	<i>Syncerus caffer nanus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Hogan <i>et al.</i> , 2014)
52	Órix da Arábia	<i>Oryx leucoryx</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Positivo	Positivo	Não	-	-
53	Órix da Arábia	<i>Oryx leucoryx</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Positivo	Não	-	-
54	Áxis	<i>Axis axis axis</i>	Cervidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986)
55	Áxis	<i>Axis axis axis</i>	Cervidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986)
56	Áxis	<i>Axis axis axis</i>	Cervidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986)
57	Ádax	<i>Addax nasomaculatus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986; Van Winckle, 1985)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
58	Ádax	<i>Addax nasomaculatus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986; Van Winckle, 1985)
59	Ádax	<i>Addax nasomaculatus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986; Van Winckle, 1985)
60	Ádax	<i>Addax nasomaculatus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986; Van Winckle, 1985)
61	Urso Pardo	<i>Ursus arctos</i>	Ursidae	Carnivora	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Ravaszova <i>et al.</i> , 2012)
62	Urso Pardo	<i>Ursus arctos</i>	Ursidae	Carnivora	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Ravaszova <i>et al.</i> , 2012)
63	Urso Pardo	<i>Ursus arctos</i>	Ursidae	Carnivora	Pool	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Ravaszova <i>et al.</i> , 2012)
64	Niala	<i>Tragelaphus angasii</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Positivo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i> genótipo de cervídeos	(Ryan <i>et al.</i> , 2003)
65	Gibão de Mãos Brancas	<i>Hylobates lar</i>	Hylobatidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Gillespie <i>et al.</i> , 2013)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
66	Siamango	<i>Symphalangus syndactylus</i>	Hylobatidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
67	Macaco Aranha da Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	Atelidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
68	Macaco Diana	<i>Cercopithecus diana</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
69	Macaco de Nariz Branco	<i>Cercopithecus ascanius ascanius</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
70	Macaco de Goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
71	Macaco de Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
72	Macaco Cauda de Leão	<i>Macaca silenus</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
73	Mico Leão Dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
74	Saimiri da Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	Cebidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
75	Saguim de Mãos Douradas	<i>Saguinus midas</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
76	Saguim Imperador	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
77	Saguim Bicolor	<i>Saguinus bicolor</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
78	Lémure Preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Lemuridae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Gómez <i>et al.</i> , 2000)
79	Lémure de Fronte Branca	<i>Eulemur albifrons</i>	Lemuridae	Primates	Individual	Positivo	Negativo	Não	-	-
80	Lémure Preto e Branco de Colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	Lemuridae	Primates	Individual	Positivo	Negativo	Não	-	-
81	Lémure Preto e Branco de Colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	Lemuridae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
82	Lémure de Cauda Anelada	<i>Lemur catta</i>	Lemuridae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Fagiolini <i>et al.</i> , 2010; Villers <i>et al.</i> , 2008)
83	Lémure de Cauda Anelada	<i>Lemur catta</i>	Lemuridae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Fagiolini <i>et al.</i> , 2010; Villers <i>et al.</i> , 2008)
84	Lémure Vermelho	<i>Varecia rubra</i>	Lemuridae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
85	Koala	<i>Phascolarctos cinereus</i>	Phascolarctidae	Diprotodontia	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. fayeri</i>	(Feng <i>et al.</i> , 2011; Morgan <i>et al.</i> , 1999)
86	Elefante Africano	<i>Loxodonta africana</i>	Elephantidae	Proboscidea	Individual	Positivo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Samra <i>et al.</i> , 2011)
87	Elefante Africano	<i>Loxodonta africana</i>	Elephantidae	Proboscidea	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Samra <i>et al.</i> , 2011)
88	Elefante Africano	<i>Loxodonta africana</i>	Elephantidae	Proboscidea	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Samra <i>et al.</i> , 2011)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
89	Elefante Africano	<i>Loxodonta africana</i>	Elephantidae	Proboscidea	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Samra <i>et al.</i> , 2011)
90	Elefante Africano	<i>Loxodonta africana</i>	Elephantidae	Proboscidea	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Samra <i>et al.</i> , 2011)
91	Elefante Africano	<i>Loxodonta africana</i>	Elephantidae	Proboscidea	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Samra <i>et al.</i> , 2011)
92	Cobos de leite	<i>Kobus leche</i>	Bovidae	Artiodactyla	Pool	Negativo	Negativo	Não	-	-
93	Panda Vermelho	<i>Ailurus fulgens</i>	Ailuridae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato e <i>C. andersoni</i>	(Karanis <i>et al.</i> , 2007)
94	Zebra de Grevy	<i>Equus grevyi</i>	Equidae	Perissodactyla	Individual	Positivo	Positivo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Mtambo <i>et al.</i> , 1997)
95	Bongo	<i>Tragelaphus eurycerus</i>	Bovidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i>	(Geurden <i>et al.</i> , 2009; Gómez <i>et al.</i> , 2000)
96	Guaxinim	<i>Procyon lotor</i>	Procyonidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i> ; <i>C. sp</i> genótipo de doninha	(Chavez <i>et al.</i> , 2012; Lesnianska <i>et al.</i> , 2016; Martin & Zeidner, 1992; Miller <i>et al.</i> , 1990; Perz & Le Blancq, 2001; Zhou <i>et al.</i> , 2004; Ziegler <i>et al.</i> , 2007a)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
97	Muntjac Chinês	<i>Muntiacus reevesi</i>	Cervidae	Artiodactyla	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i>	(Sturdee <i>et al.</i> , 1999)
98	Leão Africano	<i>Panthera leo</i>	Felidae	Carnivora	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
99	Babuino Hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
100	Macaco do Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Cercopithecidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Miller <i>et al.</i> , 1990)
101	Macaco Uivador Preto	<i>Alouatta caraya</i>	Atelidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
102	Macaco Capuchinho de Peito Amarelo	<i>Cebus xanthosternus</i>	Cebidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
103	Mico Leão de Juba Dourada	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
104	Saguim de Tufos Negros	<i>Callithrix penicillata</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
105	Saguim Cabeça de Algodão	<i>Saguinus oedipus</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium sp.</i>	(Heuschele <i>et al.</i> , 1986)
106	Saguim Comum	<i>Callithrix jacchus</i>	Callitrichidae	Primates	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. parvum</i>	(Hahn & Capuano III, 2010)
107	Urso Formigueiro Gigante	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Myrmecophagidae	Xenarthra	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
108	Dragão de Komodo	<i>Varanus komodoensis</i>	Varanidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
109	Pitão Sanguíneo	<i>Python curtus</i>	Pythonidae	Squamata	Individual	Negativo	Positivo	Não	-	-

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
110	Pitão de Cheyney	<i>Morelia spilota cheynei</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Positivo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato e <i>C. andersoni</i>	(Yimming <i>et al.</i> , 2016)
111	Pitão de Cheyney	<i>Morelia spilota cheynei</i>	Boidae	Squamata	Individual	Positivo	Positivo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato e <i>C. andersoni</i>	(Yimming <i>et al.</i> , 2016)
112	Pitão da Birmânia	<i>Python molurus bivittatus</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
113	Lagarto Barbudo	<i>Pogona vitticeps</i>	Agamidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. serpentis</i> e <i>C. saurophilum</i>	(Xiao <i>et al.</i> , 2004b)
114	Serpente Rei da Califórnia	<i>Lampropeltis getula californiae</i>	Colubridae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. serpentis</i>	(Yimming <i>et al.</i> , 2016)
115	Boa Madagáscar	<i>Acrantophis madagascariensis</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
116	Boa de Dumeril	<i>Acrantophis dumerili</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
117	Monstros de Gila	<i>Heloderma suspectum</i>	Helodermatidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
118	Cobra do Milho	<i>Pantherophis guttatus</i>	Colubridae	Squamata	Individual	Negativo	Positivo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato; <i>C. serpentis</i> ; <i>C. varanii</i> ; <i>C. sp.</i> genótipo de lagarto	(Abe & Matsubara, 2015; Kimbell III <i>et al.</i> , 1999; Plutzer & Karanis, 2007; Richter <i>et al.</i> , 2011; Yimming <i>et al.</i> , 2016)

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
119	Tartaruga Estrela Indiana	<i>Geochelone elegans</i>	Testudinidae	Testudines	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp genótipo de tartaruga	(Alves <i>et al.</i> , 2005)
120	Tartaruga do Egipto	<i>Testudo kleinmanni</i>	Testudinidae	Testudines	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Graczyk <i>et al.</i> , 1998)
121	Hidrossauros da Filipinas	<i>Hydrosaurus pustulatus</i>	Agamidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
122	Serpente Rei da Califórnia	<i>Lampropeltis getula californiae</i>	Colubridae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. serpentis</i>	(Yimming <i>et al.</i> , 2016)
123	Cobra Falsa Coral	<i>Lampropeltis triangulum</i>	Colubridae	Squamata	Individual	Positivo	Positivo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato	(Yimming <i>et al.</i> , 2016)
124	Lagarto de Gola	<i>Chlamydosaurus kingii</i>	Agamidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>Cryptosporidium</i> sp.	(Orós <i>et al.</i> , 1998)
125	Camaleão do Iémen	<i>Chamaeleo calypttratus</i>	Chamaeleonidae	Squamata	Individual	Negativo	Positivo	Sim	<i>C. varanii</i>	(Abe & Matsubara, 2015)
126	Camaleão do Iémen	<i>Chamaeleo calypttratus</i>	Chamaeleonidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Sim	<i>C. varanii</i>	(Abe & Matsubara, 2015)
127	Tartaruga Espinhosa	<i>Heosemys spinosa</i>	Emydidae	Chelonia	Individual	Positivo	Positivo	Não	-	-
128	Hidrossauro da Filipinas	<i>Hydrosaurus pustulatus</i>	Agamidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
129	Anaconda Amarela	<i>Eunectes notaeus</i>	Boidae	Squamata	Pool	Negativo	Negativo	Não	-	-
130	Anaconda Amarela	<i>Eunectes notaeus</i>	Boidae	Squamata	Pool	Positivo	Negativo	Não	-	-
131	Boa de Cuba	<i>Epicrates angulifer</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-

Anexo I (Continuação) – Lista de todos os animais do Jardim Zoológico analisados, com informação sobre posteriores ocorrências sobre a presença de *Cryptosporidium* nos mesmos, incluindo a espécie.

Amostra Número	Nome comum	Nome científico	Família	Ordem	Amostra (Individual/ Pool)	Ziehl-Neelsen Modificada	PCR Quantitativo em Tempo Real	Ocorrência registada de <i>Cryptosporidium</i>	Espécie identificada	Referência
132	Cobra Falsa Coral	<i>Lampropeltis triangulum</i>	Colubridae	Squamata	Individual	Negativo	Positivo	Sim	<i>C. parvum</i> genótipo de rato	(Yimming <i>et al.</i> , 2016)
133	Boa da Jamaica	<i>Epicrates subflavus</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
134	Boa de Dumeril	<i>Acrantophis dumerili</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Negativo	Não	-	-
135	Serpente Rei da Califórnia	<i>Lampropeltis getula californiae</i>	Colubridae	Squamata	Individual	Negativo	Positivo	Sim	<i>C. serpentis</i>	(Yimming <i>et al.</i> , 2016)
136	Pitão Real	<i>Python regius</i>	Boidae	Squamata	Individual	Negativo	Positivo	Sim	<i>C. baileyi</i> , <i>C. muris</i> e <i>C. parvum</i> ; <i>C. parvum</i> genótipo de rato; <i>C. sp</i> genótipo de rato	(Richter <i>et al.</i> , 2011; Yimming <i>et al.</i> , 2016)
137	Pitão Real	<i>Python regius</i>	Boidae	Squamata	Individual	Positivo	Positivo	Sim	<i>C. baileyi</i> , <i>C. muris</i> e <i>C. parvum</i> ; <i>C. parvum</i> genótipo de rato; <i>C. sp</i> genótipo de rato	(Richter <i>et al.</i> , 2011; Yimming <i>et al.</i> , 2016)